



**HAL**  
open science

# D'où viennent-ils et où vont-ils ? Caractériser et comprendre les facteurs impliqués dans la dispersion biologique des arthropodes d'intérêt en santé

Karine Huber

## ► To cite this version:

Karine Huber. D'où viennent-ils et où vont-ils ? Caractériser et comprendre les facteurs impliqués dans la dispersion biologique des arthropodes d'intérêt en santé. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Montpellier, 2022. tel-04176646

**HAL Id: tel-04176646**

**<https://hal.inrae.fr/tel-04176646v1>**

Submitted on 3 Aug 2023

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Université de Montpellier - Ecole Doctorale GAIA (584)

Habilitation à Diriger des Recherches

Dossier de candidature

*D'où viennent-ils et où vont-ils ?  
Caractériser et comprendre les facteurs  
impliqués dans la dispersion biologique des  
arthropodes d'intérêt en santé*

Karine HUBER

UMR ASTRE

« Animal, santé, territoires, risques et écosystèmes »

Université de Montpellier, Cirad, INRAE

**Composition du jury**

|  |            |
|--|------------|
| Emilie Bouhsira, ENVT, Toulouse                        | Rapporteur |
| Olivier Plantard, INRAE, Nantes                        | Rapporteur |
| Jérôme Depaquit, Université de Reims Champagne-Ardenne | Rapporteur |
| Fabrice Chandre, IRD, Montpellier                      | Examineur  |
| Thomas Pollet, INRAE, Montpellier                      | Examineur  |
| Sophie Thevenon, Cirad, Montpellier                    | Examineur  |



# Table des matières

---

|  |    |
|--|----|
| Liste des tableaux et des figures .....  | 4  |
| Liste des abréviations .....   | 6  |
| <i>Curriculum vitae</i> .....  | 7  |
| Publications et communications .....   | 8  |
| 1. Articles dans des journaux à comité de lecture .....  | 8  |
| 2. Chapitres d'ouvrages .....  | 12 |
| 3. Publications dans d'autres ouvrages .....   | 12 |
| 4. Communications orales et posters .....  | 12 |
| 4.1. Communications orales .....   | 12 |
| 4.2. Posters .....   | 14 |
| Encadrements d'étudiants, enseignement, formation et expertise .....                               | 16 |
| 1. Encadrements d'étudiants .....  | 16 |
| 1.1. Thèses d'université .....   | 16 |
| 1.2. Encadrement d'étudiants BAC+4, BAC+5 .....  | 17 |
| 1.3. Encadrement d'étudiants BAC+2, BAC+3 .....  | 17 |
| 1.4. Autres encadrements diplômants .....  | 18 |
| 2. Formation et transfert de compétences pour les partenaires .....                                | 19 |
| 2.1. Enseignement universitaire .....  | 19 |
| 2.2. Autres enseignements et transferts de compétences .....                                       | 19 |
| 3. Evaluation de la recherche et expertise .....   | 20 |
| 3.1. Comités et jurys de thèse .....   | 20 |
| 3.2. Autres activités d'évaluation et d'expertise .....  | 20 |
| Coordination et participation à des projets de recherche .....                                     | 22 |
| Animation et gestion de la recherche .....   | 24 |
| 1. Plateforme insectarium de Baillarguet .....   | 24 |
| 1.1. Responsable du suivi scientifique et technique de la plateforme .....                         | 24 |
| 1.2. Membre du comité exécutif Vectopole Sud et du bureau exécutif EMERG'IN .....                  | 24 |
| 1.3. Point focal des projets Infravec2 et ISIDORE .....  | 25 |
| 2. Management de proximité et participation à la direction d'unité .....                           | 25 |
| 2.1. Co-animation du Collectif Vecteur .....   | 25 |
| 2.2. Chargée de mission INRAE au sein de l'UMR ASTRE .....   | 26 |
| Description des activités de recherche .....   | 28 |
| 1. Présentation de mes thématiques de recherche : qui sont-ils, d'où viennent-ils et où vont-ils ? |    |
| Génétique des populations de vecteurs d'intérêt en santé .....                                     | 28 |
| 1.1. Qui sont-ils ? Connaître et identifier les espèces vectrices .....                            | 29 |

|  |    |
|--|----|
| 1.2. D'où viennent-ils et où vont-ils ? Caractériser et de comprendre les facteurs impliqués dans les processus d'invasions biologiques ou de dispersion des arthropodes ..... | 30 |
| 1.3. Présentation générale des modèles d'étude .....   | 31 |
| 1.3.1. Les moustiques du genre <i>Aedes</i> .....  | 31 |
| 1.3.2. Les moucheron du genre <i>Culicoides</i> .....  | 32 |
| 1.3.3. Les tiques dures des genres <i>Amblyomma</i> et <i>Hyalomma</i> .....   | 34 |
| 2. Travaux de recherche et principaux résultats .....  | 36 |
| 2.1. Recherches développées sur les moustiques de l'espèce <i>Ae. aegypti</i> .....  | 36 |
| 2.1.1. Analyse spatiale et temporelle de la variabilité génétique d' <i>Ae. aegypti</i> au Sud Vietnam ....  | 36 |
| 2.1.2. Diversité et structure génétique des populations domestiques et selvatiques d' <i>Ae. aegypti</i> en Afrique de l'Ouest .....   | 36 |
| 2.2. Recherches développées sur le modèle <i>Culicoides</i> .....  | 38 |
| 2.2.1. Expansion et colonisation du bassin méditerranéen par <i>Culicoides imicola</i> (Diptera : Ceratopogonidae).....  | 38 |
| 2.2.2. Diversité génétique et dispersion de <i>Culicoides obsoletus</i> (Diptera : Ceratopogonidae) en région paléarctique .....   | 45 |
| Diversité cryptique au sein du complexe <i>Obsoletus/Scoticus</i> à l'échelle européenne.....  | 46 |
| Une forte connectivité des populations de <i>C. obsoletus</i> à l'échelle européenne .....   | 48 |
| D'importantes capacités de dispersion de <i>Culicoides obsoletus</i> .....   | 51 |
| 2.2.3. Autres travaux en taxonomie moléculaire sur le genre <i>Culicoides</i> .....  | 54 |
| 2.3. Travaux sur les tiques et maladies à tiques.....  | 56 |
| 2.3.1. Faibles tailles efficaces d' <i>A. variegatum</i> en Afrique de l'Ouest : implications sur les méthodes de contrôle basées sur l'utilisation d'acaricides .....         | 56 |
| 2.3.2. <i>Amblyomma variegatum</i> , une tique invasive.....   | 58 |
| Le rôle des activités liées à l'élevage bovin dans la colonisation de nouveaux territoires .....   | 58 |
| Structuration des population d' <i>Amblyomma variegatum</i> dans l'Océan Indien en lien avec les mouvements de leurs hôtes bovins .....  | 60 |
| Congruence des patterns phylogéographiques entre la tique <i>Amblyomma variegatum</i> et la rickettsie <i>Ehrlichia ruminantium</i> ? .....                                    | 62 |
| 2.3.3. Structuration génétique des populations d' <i>Amblyomma hebraeum</i> au Zimbabwe : interface entre faune sauvage et bétail domestique. ....                             | 65 |
| 2.3.4. Invasion biologique : Confirmation de la présence de <i>Hyalomma marginatum</i> en France continentale .....  | 66 |
| Perspectives de recherche .....  | 68 |
| 1. Expansion et adaptation de la tique <i>Hyalomma marginatum</i> sur le littoral méditerranéen français..   | 68 |
| 1.1. Un imbroglio taxonomique .....  | 68 |
| 1.2. Origine des populations présentes en France et mécanismes évolutifs en jeu dans cette invasion biologique.....  | 70 |

|  |     |
|--|-----|
| 1.2.1. Inférer l'origine des populations présentes en Occitanie et leur structuration génétique actuelle .....                           | 71  |
| 1.2.2. Obtenir un aperçu des mécanismes évolutifs en jeu dans cette invasion biologique .....  | 72  |
| 2. Perspectives de recherche sur les moucheron du genre <i>Culicoides</i> .....  | 74  |
| 2.1. Circulation de <i>Culicoides imicola</i> au sein des territoires insulaires du sud-ouest de l'Océan Indien .....                    | 74  |
| 2.2. Influence de l'écologie et des préférences d'hôte sur la stucturation génétique, exemple de <i>Culicoides chiopterus</i> .....      | 75  |
| 2.3. A l'Est rien de nouveau ? .....   | 75  |
| Conclusion générale .....  | 76  |
| Choix de publications jointes au document .....  | 77  |
| Annexe 1 « Caractérisation de la variabilité génétique d' <i>Histomonas meleagridis</i> en relation avec son caractère pathogène » ..... | 151 |
| 1. Etude de la biologie et du cycle parasitaire d' <i>Histomonas</i> .....   | 151 |
| 1.1 Cinétique d'infection d' <i>H. meleagridis</i> chez la dinde .....   | 151 |
| 1.2. Implication du petit ténébrion <i>Alphitobius diaperinus</i> dans la transmission de l'histomonose ..                               | 152 |
| 2. Caractérisation de la variabilité génétique d' <i>Histomonas meleagridis</i> en relation avec son caractère pathogène. ....           | 153 |
| Références citées .....  | 155 |

---

" Je déclare avoir respecté, dans la conception et la rédaction de ce mémoire d'HDR, les valeurs et principes d'intégrité scientifique destinés à garantir le caractère honnête et scientifiquement rigoureux de tout travail de recherche, visés à l'article L.211-2 du Code de la recherche et énoncés par la Charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et la Charte d'intégrité scientifique de l'Université de Montpellier. Je m'engage à les promouvoir dans le cadre de mes activités futures d'encadrement de recherche."

# Liste des tableaux et des figures

---

Figure 1 Nombre de publications et nombre de citations par année

Figure 2 Représentation schématique des thématiques et questions de recherches traitées et modèles sur lesquels ces questions sont déclinées

Figure 3 Femelle *Aedes aegypti* et gîtes larvaires artificiels en Asie du Sud-Est

Figure 4 Adulte de *C. nubeculosus* (Meigen) et comparaison de taille entre un moustique et un culicoïde

Figure 5 Distribution géographique des six virus principaux transmis par les *Culicoides* (d'après Purse *et al.* 2015)

Figure 6 Mâle adulte *Amblyomma variegatum* et carte de distribution d'*A. variegatum* et d'*A. hebraeum* (d'après Walker and Olwage 1987, Walker *et al.* 2003)

Figure 7 Mâle et femelle de *H. marginatum* et répartition connue de *H. marginatum* en Europe en 2021 (Source EFSA)

Figure 8 Hypothèses de colonisation du bassin méditerranéen par *C. imicola*

Figure 9 Clustering génétique des populations de *C. imicola* et réseau d'haplotypes des séquences mitochondriales COI

Figure 10 Clustering génétique des populations de *C. imicola* basé sur les données microsatellites

Figure 11 Scénarios permettant d'expliquer la diversité génétique et la distribution actuelles de *C. imicola*

Figure 12 Arbre en neighbor-joining et résultats de clustering génétique obtenu à partir des données microsatellites pour les populations de *C. imicola*

Figure 13 Introduction de *C. imicola* à partir de la Corse liée au transport par les vents

Figure 14 Carte préliminaire de rugosité estimée et des chemins de dispersion à moindre coût pour *C. imicola* dans la partie Ouest du Bassin méditerranéen

Figure 15 Carte de la distribution géographique et de l'abondance de *Culicoides imicola* dans le Var et les Alpes Maritimes d'après les données de surveillance obtenues entre 2003 et 2019

Figure 16 Structure génétique des populations de *Culicoides imicola* à partir des données microsatellites

Figure 17 Sites d'échantillonnage des mouches piqueuses représentés par le nombre d'individus par clade au sein du Complexe *Obsoletus/Scoticus*

Figure 18 Arbre phylogénétique en maximum de vraisemblance des gènes concaténés (COI ; 16S rDNA) représentant la délimitation des espèces et les relations au sein du complexe *Obsoletus/Scoticus*

Figure 19 Réseau d'haplotype des séquences mitochondriales COI de *C. obsoletus*

Figure 20 Représentation graphique des quatre scénarios simulés à l'aide d'une approche approximate bayesian computation (ABC) sur des données microsatellites

Figure 21 Hypothèse de scénario d'expansion mondiale de *C. obsoletus*.

Figure 22 Analyses de génétique des populations et du paysage effectuées dans le cadre de l'étude des facteurs environnementaux qui influent sur les flux génétiques de *C. obsoletus* à l'échelle française

Figure 23 (A) Isolement anisotrope par la distance, corrélation entre les distances géographiques projetées par angle et les distances génétiques interindividuelles (aR, (Rousset 2000)) (B) Bearing analysis, corrélation entre les distances génétiques (aR) et géographiques en fonction de l'angle entre les sites d'échantillonnage

Figure 24 Carte de la direction moyenne des vents en France entre 2000 et 2010

Figure 25 Révision taxonomique et systématique des sous-genres *Avaritia* Fox, *Remmia* Glukhova, et des groupes Milnei et Similis

Figure 26 Analyse en composantes principales basée sur le polymorphisme des huit loci microsatellites pour *A. variegatum*

Figure 27 Aires de distribution d'*A. variegatum* et des lignées mitochondriales (16SrDNA et Cytb) identifiées

Figure 28 Origine et routes de migration des bovins domestiques en Afrique (Source : Unité graphique, ILRI (2006).

Figure 29 Répartition des lignées « mondiale » et « Afrique de l'est » d'*A. variegatum* à Madagascar, déterminées par séquençage des gènes mitochondriaux 16SrDNA et Cytb

Figure 30 Réseau en split decomposition de 97 génotypes d'*E. ruminantium* obtenus à partir de cinq gènes de ménage concaténés

Figure 31 Arbre phylogénétique inférence bayésienne des gènes concaténés Cytb et 16SrDNA pour *A. variegatum*

Figure 32 Arbres phylogénétiques en Neighbor-joining obtenues à partir des tiques *Hyalomma* collectés de 2007 à 2015 dans le sud de la France et histogrammes correspondants des distances génétiques intraspécifiques et interspécifiques, pour 12S et COI

Figure 33 Localisation des sites d'échantillonnage de *Hyalomma marginatum* dans 14 départements français

Figure 34 Exemple de lésions caecales et hépatiques de score 3 chez une dinde infectée par *H. meleagridis*

Tableau 1 : Liste des journaux scientifiques et nombre de publications (Facteurs d'impact d'après <https://jcr.clarivate.com/jcr/home>)

Tableau 2 Deux situations contrastées concernant la résistance aux acaricides chez les tiques dures

Encadré 1 : quels marqueurs pour comprendre l'introduction et l'extension de l'aire de répartition de *H. marginatum* ?

## Liste des abréviations

---

*Aaa* : *Aedes aegypti aegypti*

*Aaf* : *Aedes aegypti formosus*

ABC : Approximate Bayesian Computation

BTV : Blue tongue virus

DEA : diplôme d'études approfondies

DGAI : direction générale de l'alimentation

EHDV : epizootic hemorrhagic disease virus

EIR-A : École internationale de recherche d'Agreenium

ESFRI : European Strategy Forum on Research Infrastructures

UE : Union Européenne

FVR : fièvre de la Vallée du Rift

IAHP : influenza aviaire hautement pathogène

EFSA : Autorité européenne de sécurité des aliments

FAO : Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture

SOOI : sud-ouest de l'océan Indien

FCO : fièvre catarrhale ovine

SBV : maladie de Schmallenberg

COI : Cytochrome Oxidase I

Cytb : Cytochrome b

PI : Principal Investigator

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

MTA : Material Transfer Agreement

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

## Curriculum vitae

---

**Karine HUBER**, née le 6 décembre 1973 à Strasbourg (Bas-Rhin)

### **Affiliation et coordonnées**

Chargée de recherche INRAE en entomologie médicale et vétérinaire  
UMR « Animal, santé, territoires, risques et écosystèmes » (UMR ASTRE)  
CIRAD, Campus International de Baillarguet, TA A-117/E  
34398 Montpellier cedex 5, France  
Téléphone. : +33 4 67 59 37 01 / Email : karine.huber@inrae.fr

### **Principales qualifications**

Entomologie médicale et vétérinaire  
Génétique des populations, phylogéographie et génétique du paysage  
Taxonomie moléculaire  
Biologie moléculaire

### **Parcours universitaire et professionnel**

#### **1995-1997 : Maîtrise de Sciences Biologiques et Médicales**

C1 Statistique, informatique et modélisation 1997 (première session) Université Paris XI (Paris Sud)  
C1 Parasitologie générale 1996 (première session) Université Strasbourg I (Université Louis Pasteur)  
C2 Parasitologie spécialisée 1995 (première session) Université Strasbourg I (Université Louis Pasteur)

#### **1992- 1997 : Etudes pharmaceutiques**

Etudes effectuées à l'Université Strasbourg I (Université Louis Pasteur)  
Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie obtenu en 1997 avec mention très honorable.  
Thèse d'exercice sur « Les Trombiculidae, importance médicale et vétérinaire », sous la direction de Mr le Professeur B. Pesson.

#### **1997-1998 : Diplôme d'Etude Approfondie (DEA) Interactions hôtes-parasites**

1998 (première session) Université Paris XII (Créteil)  
Stage de DEA dans l'Unité d'Ecologie des Systèmes Vectoriels de l'Institut Pasteur Paris sur le thème « Microsatellites et génétique des populations d'*Aedes aegypti* », sous la direction de Mme A.-B. Failloux.

#### **1998-2001 : Doctorat d'université, Spécialité « Interactions hôtes-parasites »**

Université Paris XII (Créteil) obtenue avec mention très honorable avec félicitations.  
Sujet : « Structure génétique d'*Aedes aegypti*, le vecteur des virus de la dengue : analyse spatiale et temporelle de la variabilité génétique », sous la direction de Mme A.-B. Failloux.  
Laboratoire d'accueil : Unité d'Ecologie des Systèmes Vectoriels, Institut Pasteur, Paris.

#### **Janvier 2002-Octobre 2002 : Contrat post-doctoral**

Unité d'Ecologie des Systèmes Vectoriels de l'Institut Pasteur Paris sur le thème « Développement de marqueurs AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) en génétique des populations ».

#### **Octobre 2002 -Septembre 2003 : Contrat post-doctoral**

Unité de zoologie médicale, Institut Pasteur de Dakar, Sénégal : « Rôle d'*Aedes aegypti* dans l'interaction des cycles selvatiques et épidémique de dengue 2 : aspects génétiques et moléculaires ».

#### **Novembre 2003-Octobre 2007 : Chargée de recherche 2<sup>ème</sup> classe INRA**

UMR 958 INRA/Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon « Protozoaires entériques des Volailles ». Les activités de recherches menées sur ce poste sont résumées en annexe 1.

#### **Depuis novembre 2007 : Chargée de recherche 1<sup>ère</sup> classe (Chargée de recherche classe normale en 2017) INRAE**

UMR 1309 INRAE, CIRAD, « Contrôle des maladies animales exotiques et émergentes » (devenue UMR ASTRE « Animal, santé, territoires, risques et écosystèmes » en 2017), Collectif Vecteurs.

## Publications et communications

---

### **Politique de publication :**

Les publications produites suivent les « bonnes pratiques de publication » élaborées par le conseil d'unité de l'UMR ASTRE. Celles-ci permettent de clarifier les règles de signature des publications et de reconnaître au mieux les contributions de chacun (agent de l'UMR et partenaires du sud et du nord) dans les productions scientifiques de l'unité. Les agents de l'UMR considèrent que la collecte de données fait partie intégrante de la création de contenu de même que la recherche de financement. Au sein du Collectif Vecteurs de l'UMR ASTRE, les étudiants en thèse sont systématiquement placés en premier auteur de leurs travaux de thèse. Les encadrants et directeurs de thèse, lorsque leur contribution au travail est jugée identique alternent selon les publications les places de second et derniers auteurs.

En souligné, figurent les étudiants encadrés dans le cadre du travail.

### 1. Articles dans des journaux à comité de lecture

1. **Huber, K.**, Mousson, L., Rodhain, F., Failloux, A.-B., 1999. Microsatellite sequences as markers for population genetic studies of the mosquito *Aedes aegypti*, the vector of dengue viruses. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 61, 1001-1003.
2. **Huber, K.**, Luu Le, L., Tran Huu, H., Nguyen Huu, C., Tran Khanh, T., Rodhain, F. et Failloux A.-B., 2000. *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linné) 1762, le principal vecteur des virus de la dengue au Sud Vietnam : écologie, structure génétique, compétence vectorielle et résistance aux insecticides. *Annales de la Société Entomologique de France* 36, 109-120.
3. **Huber, K.**, Mousson, L., Rodhain, F., Failloux, A.-B., 2001. Isolation and variability of polymorphic microsatellite loci in *Aedes aegypti*, the vector of dengue viruses. *Molecular Ecology Notes* 1, 219-222.
4. Ton Nu Van Anh, Mousson, L., **Huber, K.**, Le Viet Lo, Failloux, A.-B., 2001. *Aedes aegypti* (Linné, 1762) and *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera : Culicidae) in dengue transmission in Nha Trang (South Vietnam) : preliminary results. *Annales de la Société Entomologique de France* 37, 473-479.
5. **Huber, K.**, Luu Le, L., Tran Huu, H., Tran Khanh, T., Rodhain, F., Failloux A.-B., 2002. Temporal genetic variation of *Aedes aegypti* populations in Ho Chi Minh City (Vietnam). *Heredity* 89, 7-14.
6. **Huber, K.**, Luu Le, L., Tran Huu, H., Ravel, S., Rodhain, F., Failloux, A.-B. 2002. Microsatellite markers for differentiating *Aedes aegypti* in Ho Chi Minh City (Viet Nam). *Molecular Ecology* 11, 1629-1635.
7. **Huber K.**, Luu Le L., Tran Huu H., Tran Khanh T., Rodhain F., A.-B. Failloux. 2002. *Aedes aegypti*, le vecteur des virus de la dengue : structure spatio-temporelle de la variabilité génétique. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* 7, 1237-1250.
8. **Huber, K.**, Luu Le, L., Tran Huu, H., Tran Khanh, T., Rodhain, F., Failloux, A.-B., 2003. *Aedes aegypti* in South Vietnam: ecology, genetic structure, vectorial competence and resistance to insecticides. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 34, 81-86.
9. David, J.P., **Huber, K.**, Failloux, A.-B., Rey, D., Meyran, J.C., 2003. The role of environment in shaping the genetic diversity of the subalpine mosquito, *Aedes rusticus* (Diptera, Culicidae). *Molecular Ecology* 12, 1951-1961.
10. **Huber, K.**, Luu Le, L., Chantha, N., Failloux, A.-B. 2004. Human displacements shape *Aedes aegypti* gene flow in Southeast Asia. *Acta Tropica* 90, 23-29.
11. Paupy, C., Orsoni, A., Mousson, L., **Huber, K.**, 2004. Comparisons of amplified fragment length polymorphism (AFLP), microsatellite and isoenzyme markers: population genetics of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Phnom Penh (Cambodia). *Journal of Medical Entomology* 41, 664-671.

12. Paupy, C., Ngan Chantha, **Huber, K.**, Lecoz, N., Reynes, J.-M., Rodhain, F., Failloux, A.-B., 2004. Influence of breeding sites features on genetic differentiation of *Aedes aegypti* populations analyzed on a local scale in Phnom Penh Municipality (Cambodia). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 71, 73-81.
13. **Huber, K.**, Chauve, C, Zenner, L. 2005. Detection of *Histomonas meleagridis* in turkeys cecal droppings by PCR amplification of the small subunit ribosomal DNA sequence. *Veterinary Parasitology* 131, 311-316.
14. **Huber, K.**, Reynaud, M.-C., Callait, M.-P., Zenner L., 2006. *Histomonas meleagridis* in turkeys: dissemination kinetics in host tissues after cloacal infection. *Poultry Science* 85, 1008-1014.
15. **Huber, K.**, Gouilloud, L., Zenner, L., 2007. Preliminary study: potential role of the lesser mealworm *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) in the transmission of *Histomonas meleagridis* (Protozoa: Sarcocystidae). *Avian pathology* 36, 279-282.
16. **Huber, K.**, Ba, Y., Dia, I., Mathiot, C., Sall, A.A., Diallo, M., 2008. *Aedes aegypti* in Senegal: genetic diversity and genetic structure of domestic and sylvatic populations. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 79, 218-229.
17. Adakal, H., Meyer, D., Carasco-Lacombe, C., Pinarello, V., Allègre, F., **Huber, K.**, Stachurski, F., Morand, S., Martinez, D., Lefrançois, T., Vachieri, N., Frutos, R., 2009. MLST scheme of *Ehrlichia ruminantium*: genomic stasis and recombination in strains from Burkina-Faso Infection, Genetics and Evolution 9, 1320-1328.
18. Adakal, H., Gavotte, L., Stachurski, F., Konkobo, M., Henri, H., Zoungrana, S., **Huber, K.**, Vachieri, N., Martinez, D., Morand, S., Frutos, R., 2010. Clonal origin of emerging populations of *Ehrlichia ruminantium* in Burkina Faso. *Infection, Genetics and Evolution* 10, 903-912.
19. **Huber, K.**, Zenner, L., Bicout, D. 2010. Modelling population dynamics and response to management options in the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae). *Veterinary Parasitology* 176, 65-73.
20. Stachurski, F., Tortosa, P., Rahajarison, P., Jacquet, S., Yssouf, A., **Huber, K.**, 2013. New data regarding distribution of cattle ticks in the south-western Indian Ocean Islands. *Veterinary Research* 44, 79.
21. Jacquet, S., Garros, C., Lombaert, E., Walton, C., Restrepo, J., Allene, X., Baldet, T., Cetre-Sossah, C., Chaskopoulou, A., Delécolle, J. C., Desvars, A., Djerbal, M., Fall, M., Gardes, L., De Garine-Wichatitsky, M., Goffredo, M., Gottlieb, Y., Gueye Fall, A., Kasina, A, Labuschagne, K., Lhor, Y., Lucientes, J., Martin, T., Mathieu, B., Miranda, M. A., Pages, M., Pereida Da Fonseca, I., Ramilo, D. W., Segard, A., Setier-Rio, M. L., Stachurski, F., Tabbabi, A., Talla Seck, M., Venter, G., Zimba, M., Balenghien, T., Guis, H., Chevillon, C., Bouyer, J, **Huber, K.**, 2015. Colonization of the Mediterranean Basin by the vector biting midge species *Culicoides imicola*: an old story. *Molecular Ecology* 24, 5707-5725.
22. Jacquet, S., **Huber, K.**, Pagès, N., Talavera, S., Burgin, L. E., Carpenter, S., Sanders, C., Dicko, A. H., Djerbal, M., Lhor, Y., Lucientes, J., Miranda, M. A., Pereira Da Fonseca, I., Ramilo, D. W., Setier-Rio, M. L., Bouyer, J., Chevillon, C., Balenghien, T., Guis, H., Garros, C. 2016. Range expansion of the Bluetongue vector, *Culicoides imicola*, in continental France likely due to rare wind-transport events. *Scientific Reports* 6, 27247
23. Jacquet, S., **Huber, K.**, Guis, H., Setier-Rio, M. L., Goffredo, M., Allene, X., Rakotoarivony, I., Chevillon, C., Bouyer, J., Baldet, T., Balenghien, T., Garros, C., 2016. Spatio-temporal genetic variation of the biting midge vector species *Culicoides imicola* (Ceratopogonidae) Kieffer in France. *Parasite & Vectors* 9, 141.
24. Pagabeleguem, S., Ravel, S., Dicko, A.H., Vreysen, M.J.B., Parker, A., Takac, P., **Huber, K.**, Sidibe, I., Gimonneau, G., Bouyer, J., 2016. Influence of temperature and relative humidity on survival and fecundity of three tsetse strains. *Parasites & Vectors* 9, 520.
25. Cangi, N., Gordon, J.L., Bournez, L., Pinarello, V., Aprelon, R., **Huber, K.**, Lefrancois, T., Neves, L., Meyer, D.F., Vachieri, N., 2016. Recombination is a major driving force of genetic diversity in the Anaplasmataceae *Ehrlichia ruminantium*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 6, 111.
26. Vial, L., Stachurski, F., Leblond, A., **Huber, K.**, Vourc'h, G., Rene-Martellet, M., Desjardins, I., Balanca, G., Grosbois, V., Pradier, S., Gely, M., Appelgren, A., Estrada-Pena, A., 2016. Strong

evidence for the presence of the tick *Hyalomma marginatum* Koch, 1844 in southern continental France. *Ticks and Tick-Borne Diseases* 7, 1162-1167.

27. Bakhom, M.T., Labuschagne, K., **Huber, K.**, Fall, M., Mathieu, B., Venter, G., Gardes, L., Baldet, T., Bouyer, J., Fall, A.G., Gimonneau, G., Garros, C., 2018. Phylogenetic relationships and molecular delimitation of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) species in the Afrotropical region: interest for the subgenus *Avaritia*. *Systematic Entomology* 43, 355-371.
28. Bakhom, M.T., Sarr, M., Fall, A.G., **Huber, K.**, Fall, M., Sembène, M., Seck, M.T., Labuschagne, K., Gardès, L., Ciss, M., Gimonneau, G., Bouyer, J., Baldet, T., Garros, C., 2018. DNA barcoding and molecular identification of field-collected *Culicoides* larvae in the Niayes area of Senegal. *Parasites & Vectors* 11, 615.
29. Bourquia, M., Garros, C., Rakotoarivony, I., Gardes, L., **Huber, K.**, Boukhari, I., Delecolle, J.C., Baldet, T., Mignotte, A., Lhor, Y., Khallaayoune, K., Balenghien, T., 2019. Update of the species checklist of *Culicoides* Latreille, 1809 biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) of Morocco. *Parasites & Vectors* 12, 459.
30. **Huber, K.**, Jacquet, S., Rivallan, R., Adakal, H., Vachieri, N., Risterucci, A.M., Chevillon, C., 2019. Low effective population sizes in *Amblyomma variegatum*, the tropical bont tick. *Ticks and Tick-Borne Diseases* 10, 93-99.
31. Bourquia, M., Garros, C., Rakotoarivony, I., Boukhari, I., Chakrani, M., **Huber, K.**, Gardès, L., Wint, W., Baldet, T., Khallaayoune, K., 2020. Composition and seasonality of *Culicoides* in three host environments in Rabat region (Morocco). *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux* 73, 37-46.
32. Mignotte, A., Garros, C., Gardès, L., Balenghien, T., Duhayon, M., Rakotoarivony, I., Tabourin, L., Poujol, L., Mathieu, B., Ibañez-Justicia, A., Deniz, A., Cvetkovikj, A., Purse, B.V., Ramilo, D.W., Stougiou, D., Werner, D., Pudar, D., Petrić, D., Veronesi, E., Jacobs, F., Kampen, H., Pereira da Fonseca, I., Lucientes, J., Navarro, J., de la Puente, J.M., Stefanovska, J., Searle, K.R., Khallaayoune, K., Culverwell, C.L., Larska, M., Bourquia, M., Goffredo, M., Bisia, M., England, M., Robin, M., Quaglia, M., Miranda-Chueca, M.Á., Bødker, R., Estrada-Peña, R., Carpenter, S., Tchakarova, S., Boutsini, S., Sviland, S., Schäfer, S.M., Ozoliņa, Z., Segliņa, Z., Vatansever, Z., **Huber, K.**, 2020. The tree that hides the forest: cryptic diversity and phylogenetic relationships in the Palaearctic vector *Obsoletus/Scoticus* Complex (Diptera: Ceratopogonidae) at the European level. *Parasites & Vectors* 13, 265.
33. Mignotte, A., Garros, C., Dellicour, S., Jacquot, M., Gilbert, M., Gardès, L., Balenghien, T., Duhayon, M., Rakotoarivony, I., de Wavrechin, M., **Huber, K.**, 2021. High dispersal capacity of *Culicoides obsoletus* (Diptera: Ceratopogonidae), vector of bluetongue and Schmallenberg viruses, revealed by landscape genetic analyses. *Parasites & Vectors* 14, 93.

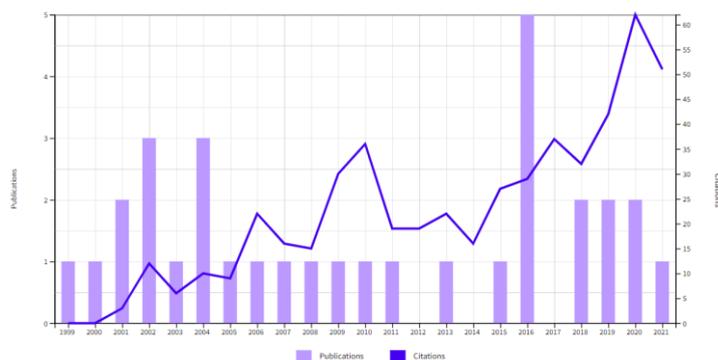


Figure 1 Nombre de publications et nombre de citations par année

Tableau 1 : Liste des journaux scientifiques et nombre de publications (Facteurs d'impact d'après <https://jcr.clarivate.com/jcr/home>)

| Nom du journal   | Facteur d'impact sur 5 ans (données 2020) | Nombre de publications | Nombre de publications en premier ou dernier auteur |
|--|---|------------------------|---|
| American Journal of Tropical Medicine and Hygiene              | 2.799                                     | 3                      | 2   |
| Annales de la Société Entomologique de France                  | 1.040                                     | 2                      | 1   |
| Molecular Ecology Notes  | 2.551                                     | 1                      | 1   |
| Heredity   | 4.553                                     | 1                      | 1   |
| Molecular Ecology  | 6.801                                     | 3                      | 2   |
| Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine                   | 0.149                                     | 1                      | 1   |
| Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health | 0.558                                     | 1                      | 1   |
| Acta Tropica   | 3.002                                     | 1                      | 1   |
| Journal of Medical Entomology                                  | 2.426                                     | 1                      | 1   |
| Veterinary Parasitology  | 2.951                                     | 2                      | 2   |
| Poultry Science  | 3.679                                     | 1                      | 1   |
| Avian pathology  | 3.237                                     | 1                      | 1   |
| Infection, Genetics and Evolution                              | 3.188                                     | 2                      |   |
| Veterinary Research  | 4.106                                     | 1                      | 1   |
| Scientific Reports   | 5.133                                     | 1                      |   |
| Parasites & Vectors  | 3.959                                     | 6                      | 2   |
| Frontiers in Cellular and Infection Microbiology               | 5.882                                     | 1                      |   |
| Ticks and Tick-Borne Diseases                                  | 3.693                                     | 2                      | 1   |
| Systematic Entomology  | 3.727                                     | 1                      |   |
| Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux  |   | 1                      |   |
| <b>Total</b>   |   | <b>33</b>              | <b>19</b>   |

## 2. Chapitres d'ouvrages

**Huber K.**, Chevillon C. (2016). Les tiques invasives. In : Tiques et maladies à tiques - Biologie, écologie évolutive, épidémiologie. Editions de l'IRD, <https://hal.inrae.fr/hal-02799818>

Bonnet S., **Huber K.**, Joncour G., René-Martellet M., Stachurski F., Zenner L. (2016). Biologie des tiques. In : Tiques et maladies à tiques - Biologie, écologie évolutive, épidémiologie. (1ère édition), 338 p., IRD Editions, <https://hal.inrae.fr/hal-02796480>

## 3. Publications dans d'autres ouvrages

**Huber K.**, L. Mousson, F. Rodhain and A.-B. Failloux. 1998. Microsatellite markers for genetic population studies in *Aedes aegypti*, the mosquito vector of dengue viruses. Acta Parasitologica Portuguesa 5 : 50.

Failloux A.-B., L. Mousson, M. Vazeille-Falcoz, **K. Huber**, F. Rodhain. 1999. Screening microsatellite markers from a size-selected *Aedes aegypti* genomic library. Arthropod Borne Virus Information Exchange (CDC, Fort Collins), 4p.

**Huber K.**, L. Mousson, F. Rodhain, A.-B. Failloux. 1999. Les microsatellites chez *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linné) 1762, le moustique vecteur des virus de la dengue. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique 92 : 283-284.

Zenner L., **K. Huber**, C. Chauve. 2004. Nouveaux éléments pronostiques et diagnostiques sur l'histomonose de la dinde. Rencontres InterProfessionnelles de Pathologie Aviaire 2004 : 94-98.

**Huber K.**, Reynaud M.-C., Chauve C, Zenner L. Détection d'*Histomonas meleagridis* par PCR, un nouvel outil de diagnostic et de suivi épidémiologique : application dans l'étude de la dissémination du parasite chez la dinde. Sixièmes Journées de la Recherche Avicole, St-Malo, 30 et 31 mars 2005 : 403-407.

**Huber K.**, Gouilloud L., Chauve C. 2005. *Alphitobius diaperinus*, le petit ténébrion et son implication dans la transmission de pathogènes chez la volaille. Bulletin des GTV 31 : 17-21.

## 4. Communications orales et posters

### 4.1. Communications orales

**Huber K.**, Luu Le L., Tran Huu H., Tran Khanh T., Rodhain F., Failloux A.-B.. *Aedes aegypti*, le vecteur des virus de la dengue : structure spatio-temporelle de la variabilité génétique. Académie Nationale de Médecine, Paris, France, séance du 8 octobre 2002.

**Huber K.**, Reynaud M.C., Chauve C., Zenner L. Cycle parasitaire d'*Histomonas meleagridis* : étude de la cinétique d'infection de la dinde par le parasite. Congrès de la Société Française de Parasitologie, Besançon, France, 25-26 mai 2005.

**Huber K.**, Belli P., Reynaud M.-C, Zenner L. Infection with *Histomonas meleagridis* in turkeys: dissemination kinetics in tissues related to pathology. International Workshop on Protozoa Orally Transmitted in Public and Animal Health, INRA Research Center, Tours Nouzilly, France, 14-15 décembre 2006.

**Huber K.**, Jacquet S., Stachurski F., Vachriery N., Aprelon R, Martinez D. *Amblyomma variegatum*, cas d'une tique colonisatrice : phylogéographie au niveau mondial et structuration dans un territoire colonisé, Madagascar. Colloque conjoint parasitologie – célébration Vet 11 « Circulation des zoonoses et des parasitoses dans l'océan Indien », Antananarivo, Madagascar, 9-11 novembre 2011.

Garros C., Jacquet S., **Huber K.**, Guichard S., Guis H., Setier-Rio M.L., Delécolle J.C., Balenghien T. *Culicoides imicola*, a recent invader in the Mediterranean Basin? Xth European Congress of Entomology, York, Royaume-Uni, 3-8 août 2014.

Cangi N., Bournez L., **Huber K.**, Pinarello V., Aprelon R., Lefrançois T., Neves L., Vachriery N. Genetic characterization of *Ehrlichia ruminantium* strains in the ticks *Amblyomma hebraeum* and *A. variegatum* from Mozambique by MSLT and MLVA. VIII International Conference on Ticks and Tick-borne Pathogens (TTP-8), Cape Town, Afrique du Sud, 24-29 août 2014.

Jacquet S., **Huber K.**, Bouyer J., Chevillon C., Garros C. 2014. *Culicoides imicola*, a recent invader in the Mediterranean Basin? European Congress of Entomology, York, Royaume-Uni, 3-8 août 2014.

Jacquet S., **Huber K.**, Bouyer J., Chevillon C., Balenghien T, Garros C. Phylogeography of *Culicoides imicola* (Diptera: Ceratopogonidae), biting midge vector species of Orbivirus: expansion and colonization? 19th European SOVE Conference, Thessalonique, Grèce, 13-17 octobre 2014.

**Huber K.**, Vachriery N., Adakal H., Cangi N., Gordon J., Haddad N., das Neves L., Stachurski F. Vector-pathogen association: lack of congruence of phylogeographical pattern of the vector tick *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) and of the Rickettsiales *Ehrlichia ruminantium*? 19th European SOVE Conference, Thessalonique, Grèce, 13-17 octobre 2014.

Jacquet S., **Huber K.**, Bouyer J., Chevillon C., Balenghien T., Garros C. Phylogeography of *Culicoides imicola* (Diptera: Ceratopogonidae), biting midge vector species of Orbivirus: expansion and colonization? 4ème Conférence internationale « Bluetongue and related Orbiviruses », Rome, Italie, 4-7 novembre 2014.

Jacquet S., **Huber K.**, Bouyer J., Chevillon C., Balenghien T., Garros C. Phylogeography of *Culicoides imicola* (Diptera: Ceratopogonidae), biting midge vector species of Orbivirus: expansion and colonization? 12ème Conférence internationale « Epidémiologie moléculaire et génétique évolutive des maladies infectieuses », Bangkok, Thaïlande, 11-13 décembre 2014.

Chalvet-Monfray K., Cat J., Agoulon A., Boué F., Cebe N., Huard F., **Huber K.**, Hoch T., Moinet M, Moutailler S., Stachurski F., Vayssier-Taussat M., Verheyden H., Vourc'H G, Cosson J-F. Projets CCEID-CLIMATICK Bilan de 5 ans de suivi des collectes de tiques et données météo. Réunion annuelle du groupe "Tiques et Maladies à Tiques" (TMT) du Réseau Ecologie des Interactions Durables (REID), Villeurbanne, France, 26 mars 2015.

**Huber K.**, Lefrancois T., Cardinale E., Esnault O., Hue T., Pannequin M, Stachurski F. Impacts majeurs des tiques en santé animale en Outre-mer. Journée thématique Tiques et maladies à tiques : impacts en santé humaine et vétérinaire, Maison-Alfort, France, 20 mai 2015.

Chalvet-Monfray K., Cat J., Agoulon A., Boué F., Cebe N., Huard F., **Huber K.**, Hoch T., Moinet M., Moutailler S., Stachurski F., Vayssier-Taussat M., Verheyden H., Vourc'H G., Cosson J.-F. Projet CC-EID : un projet pour relier météo et activité des tiques du Méta-programme de l'INRA ACCAF. Journée tique du CNEV, Maison-Alfort, 20 mai 2015.

Plantard O., Agoulon A., Barker S., Berggoetz M., Bernard J., Bouattour A., Durand A., Heylen D., **Huber K.**, Malard M-A., Mccoy K., Noureddine R., Opara M., Stachurski F., Rispe C. Molecular phylogeny of

Ixodidae based on 5 mitochondrial and nuclear genes with a focus on the *Ixodes* genus. Conference on neglected vectors and vector-borne diseases (EURNEGVEC), Saragosse, Espagne, 24-26 mai 2016.

Vernick K. D., Veronesi E., Bellini R., **Huber K.**, Zgomba M. The Infravec2 Horizon 2020 project: Research infrastructures for the control of vector-borne diseases. 7th International SOVE Congress, Palma de Majorque, Iles Baléares, Espagne, 1<sup>er</sup>-7 octobre 2017.

**Huber K.**, Jacquet J., Gardes L., Mignotte A., Balenghien T., Bouyer J., Garros C. (2017-10-01). Where do they come from? Where do they go? Population genetics studies on *Culicoides* biting midges. 7th International SOVE Congress, Palma de Majorque, Iles Baléares, Espagne, 1er-7 octobre 2017.

Baldet T., Chandre F., Deme I., Eychenne M., Grucker K., **Huber K.**, Lagneau C., Lefrancois T., Ravel S., Scheid B., Setier-Rio M.-L., Simard F., Solano P., Trevennec O., Volkoff A.-N. Vectopole Sud, a french network of platforms for research in medical, veterinary and agricultural entomology. 21th European Society for Vector Ecology Conference (E-SOVE), Palerme, Italie, 22-26 octobre 2018.

Vial L., **Huber K.**, Appelgren A., Calloix C., Andary C., Grosbois V., Lancelot R., Stachurski F. Update in the geographical distribution of the invasive tick *Hyalomma marginatum* in south of France; first attempts to identify factors favoring its establishment. 21th European Society for Vector Ecology Conference (E-SOVE), Palerme, Italie, 22-26 octobre 2018.

Vial L., Stachurski F., Duhayon M., Rakotoarivony I., Balança G., **Huber K.**, Grosbois V., Appelgren A., Calloix C., Nogarez L., Mouillaud T., Moutailler S., Poli P. E., Casabianca F. Surveillance de la tique invasive *Hyalomma marginatum* dans le sud de la France” Journées d'animation scientifique Réseau Vectopole Sud, Montpellier, France, 27-28 novembre 2019.

#### 4.2. Posters

**Huber K.**, L. Mousson, F. Rodhain, Failloux A.-B. Microsatellites markers for genetic population studies in *Aedes aegypti*, the mosquito vector of dengue viruses. European society for Vector Ecology (SOVE) XIth Meeting, Lisbonne, Portugal, 13-17 octobre 1998.

**Huber K.**, L. Mousson, F. Rodhain, Failloux A.-B. Les microsatellites chez *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linné) 1762, le moustique vecteur des virus de la dengue. Société de Pathologie Exotique, « Génétique et Maladies infectieuses dans l'environnement tropical », Paris, France, 13 octobre 1999.

**Huber K.**, Tran Khanh T., Vazeille-Falcoz M., Mousson L., Tran Huu H., Nguyen Thi H., Rodhain F., Failloux A.-B. Génétique des populations d'*Aedes aegypti*, le principal vecteur des virus de la dengue au Sud Vietnam. Société Française de Parasitologie. Montpellier, France, 1-3 mars 2000.

**Huber K.**, Mousson L., Rodhain F., Failloux A.-B. Microsatellite sequences as markers for population genetic studies of the mosquito *Aedes aegypti*. International Conference on Dengue and Dengue Haemorrhagic fever « a global challenge for the millennium », Chiang Mai, Thaïlande, 20-24 novembre 2000.

**Huber K.**, Luu Le L., Tran Huu H., Tran Khanh T., Rodhain F. and A.-B. Failloux. *Aedes aegypti* in South Vietnam : ecology, genetic structure, vectorial competence and resistance to insecticides. International Conference on Dengue and Dengue Haemorrhagic fever « a global challenge for the millennium », Chiang Mai, Thaïlande, 20-24 novembre 2000.

**Huber K.**, Mousson L., Luu Le Loan, Rodhain F., Failloux A.B. Spatial and temporal genetic variation of *Aedes aegypti* populations in Ho Chi Minh City (Vietnam). 3rd International Congress of Vector Ecology (SOVE), Barcelona (Spain), 16-21 septembre 2001.

**Huber K.**, Reynaud M.-C., Chauve C, Zenner L. Détection d'*Histomonas meleagridis* par PCR, un nouvel outil de diagnostic et de suivi épidémiologique : application dans l'étude de la dissémination du parasite chez la dinde. Sixièmes Journées de la Recherche Avicole, St-Malo, France, 30-31 mars 2005.

**Huber K.**, Vachiery N., Lefrançois T., Stachurski F., Martinez D. Phylogeography of *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae), the main vector of *Ehrlichia ruminantium*: preliminary results. 5th International congress of Vector Ecology, Belek-Antalya, Turquie, 11-16 octobre 2009.

Vachiéry N., **Huber K.**, Haddad N., Meyer D.F., Pruneau L., Saldana A., Pilet H., Berrich M., Bouchouicha R., Pinarello V., Carasco-Lacombe C., Magnan M., Adakal H., Boulouis H.-J., Martinez D., Lefrançois T. Caractérisation de la diversité génétique d'*Ehrlichia ruminantium* à l'échelle mondiale par l'approche MLVA et MLST. Colloque conjoint parasitologie – célébration Vet 11 « Circulation des zoonoses et des parasitoses dans l'océan Indien », Antananarivo, Madagascar, 9-11 novembre 2011.

Jacquet S., Dupraz M., Stachurski F., Vachiery N., Cardinale E., Girard S., Asnaoui M., Grimaud Y., Martinez D., **Huber K.** Genetic diversity of *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae), the main vector of *Ehrlichia ruminantium* in Indian Ocean Islands. 18th E-SOVE Conference, Montpellier, France, 8-11 octobre 2012.

**Huber K.**, Gardes L., Vignes H., Rivallan R., Argout X., Balenghien T., Garros C. Rapid development of microsatellite markers for *Culicoides obsoletus* using next generation sequencing. VMERGE Mid-Term Meeting, Rome, Italie 6-7 mai 2015.

Tabourin L., Gardes L., Rakotoarivony I., Mathieu B., Balenghien T., Baldet T., Garros C., **Huber K.**, Vectornet Partners. Only one species? Cryptic diversity and spatial distribution of *Culicoides obsoletus sensu lato* (Diptera: Ceratopogonidae) in Europe. 7th International SOVE Congress, Palma de Majorque, Iles Baléares, Espagne, 1<sup>er</sup>-7 octobre 2017.

Bourquia M., Balenghien T., Rakotoarivony I., Laëtiia Gardes L., Chakrani M., Boukhari I., Garros C., **Huber K.**, Khallaayoune K. *Culicoides* composition in different host-environment and updated checklist in Morocco. 7th International SOVE Congress, Palma de Majorque, Iles Baléares, Espagne, 1<sup>er</sup>-7 octobre 2017.

Mignotte A., **Huber K.**, Gardes L., Balenghien T., Duhayon M., Rakotoarivony I., Tabourin L., Martinez de la Puente J., Lucientes J., Ibanez-Justicia A., Kampen H., Werner D., England M., Carpenter S., Garros C. Landscape genetics of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) vector species: evaluation of cryptic diversity and gene flow in the Palearctic region. 21th conference of the European Society for Vector Ecology (E-SOVE), Palerme, Italie, 22-26 octobre 2018.

**Huber K.**, Jacquet S., Rivallan R., Adakal H., Vachiery N., Risterucci A.-M., Chevillon C. Low effective population sizes in *Amblyomma variegatum* in West Africa: implication for the sustainability of acaricide-based control programs. 21th European Society for Vector Ecology Conference (E-SOVE), Palerme, Italie, 22-26 octobre 2018.

## 1. Encadrements d'étudiants

### 1.1. Thèses d'université

#### **JACQUET Stéphanie (2012-2015)**

« Compréhension des processus d'expansion et de colonisation dans le bassin méditerranéen de *Culicoides imicola* ».

Université Montpellier II, Ecole doctorale SIBAGHE. Dirigée par Jérémy Bouyer et Christine Chevillon.  
Label EIR-A (École internationale de recherche d'Agreenium).

Activités et responsabilités : encadrement principal de la thèse avec C. Garros.

Publications issues du doctorat : n°21, 22, 23.

Devenir de l'étudiant : post-doctorante au Laboratoire de Biométrie et de Biologie Evolutive (LBBE) et au Centre International de Recherche en Infectiologie à Lyon.

#### **BAKHOUM Thierno (2014 -2017)**

« Ecologie et taxonomie intégrative des moucheron piqueurs du genre *Culicoides* Latreille (Diptera : Ceratopogonidae) en région Afrotropicale ».

AgroParisTech, Ecole doctorale SIBAGHE. Dirigée par Jérémy Bouyer et Christine Chevillon.

Activités et responsabilités : encadrement des activités en taxonomie moléculaire.

Publications issues du doctorat : n° 27, 28.

Devenir de l'étudiant : Contrat post-doctoral à l'ISRA, Sénégal

#### **MIGNOTTE Antoine (2017 -2020)**

« Maladies émergentes en santé animale : diversité génétique et dispersion d'une espèce de moucheron vectrice des virus de la fièvre catarrhale ovine et de de Schmallenberg en région Paléarctique, *Culicoides obsoletus* (Diptera : Ceratopogonidae) ».

Université de Montpellier, Ecole doctorale GAIA. Dirigée par C. Garros et encadrée par K. Huber.

Label EIR-A (École internationale de recherche d'Agreenium).

Activités et responsabilités : encadrement principal de la thèse.

Publications issues du doctorat : n°32, 33.

Devenir de l'étudiant : CDD technicien entomologiste chez Altopictus (entreprise spécialisée en lutte anti-vectorielle).

#### **TIVAPASI Musavengana Tapera (PhD en cours)**

“A study of tick control practices and molecular diversity of the rickettsia *Ehrlichia ruminantium* and its vector *Amblyomma hebraeum* at the Gonarezhou NP/GLTFCA livestock-wildlife interface”

Faculty of Veterinary Science, University of Zimbabwe.

PhD supervisory team : Pr Pfukenyi, T Hove, Prof D.G Vassilev, Dr M. de Garine-Wichatitsky et K. Huber.

Activités et responsabilités : encadrement des activités en génétique des populations.

Devenir de l'étudiant : thèse réalisée en parallèle à son activité professionnelle (enseignant à la Faculté des sciences vétérinaires et activités dans son laboratoire d'analyse privé). Depuis la survenue de troubles politiques et économiques dans ce pays, je suis sans nouvelles de lui.

## 1.2. Encadrement d'étudiants BAC+4, BAC+5

**Linda GOUILLOUD** (1<sup>er</sup> mars – 28 mai 2004)

« Etude du rôle du petit ténébrion (*Alphitobius diaperinus*) dans la transmission de l'histomonose ». Stage de maîtrise Biologie Cellulaire et Physiologie option microbiologie, Université Claude Bernard Lyon.

Publication issue de l'encadrement : n°15

**Arnaud AYMONIN-GLORIEUX** (10 mai – 9 juillet 2004)

« Le rôle vecteur du ténébrion (*Alphitobius diaperinus*) pour *Histomonas meleagridis*, agent de l'histomonose des galliformes »

Stage de maîtrise Biologie Cellulaire et Physiologie option Physiologie Animale, Université B. Pascal – Clermont-Ferrand.

Devenir de l'étudiant : Ingénieur d'Etude R&D chez Sopra Group

**Stéphanie JACQUET** (janvier-juin 2011)

« Etude de la structure génétique d'*Amblyomma variegatum*, tique vectrice d'*Ehrlichia ruminantium* à Madagascar ».

Master 2 Biologie Géoscience Agro ressources Environnement (BGAE), mention Biodiversité et Interaction Microbienne et Parasitaire (BIMP), spécialité Ecologie et Evolution des parasites (EEP), Université de Montpellier II, Montpellier.

Publications issues de l'encadrement : n°20, 30

Devenir de l'étudiant : doctorante Cirad, 2012-2015, label EIR-Agreenium. Post-doctorante au Laboratoire de Biométrie et de Biologie Evolutive (LBBE) et au Centre International de Recherche en Infectiologie à Lyon

**Marlène DUPRAZ** (février- juin 2012)

« Etude de la structure génétique d'*Amblyomma variegatum*, tique vectrice d'*Ehrlichia ruminantium* dans l'océan Indien ».

Master 1 Biologie des plantes, Microbiologie, Biotechnologies, Bioprocédés, Mention Interactions Micro-organismes - Hôtes – Pathogènes, Université de Montpellier II, Montpellier.

Devenir de l'étudiant : Master 2 en Microbiologie, thèse à l'IRD et contrat post-doctoral à l'IRD, VSC en entomologie UMR ASTRE, La Réunion puis recrutement en tant que chercheur acarologue au Cirad en 2021.

**Johana RESTREPO** (mars-juin 2014)

« Etude de la variabilité génétique de *Culicoides imicola* (Diptera : Ceratopogonidae), moucheron vecteur d'intérêt médical et vétérinaire, dans son aire de distribution historique »

Master 1 Ecologie-Biodiversité, Spécialité Maladies transmissibles : environnement, dynamique, Parcours « Dynamique et Emergence des Maladies Parasitaires et Infectieuses », Université de Montpellier II.

Publication issue de l'encadrement : n°21

Devenir de l'étudiant : service entomologique de la Collectivité territoriale de Guyane.

## 1.3. Encadrement d'étudiants BAC+2, BAC+3

**Alexina ORSONI** (15 juin – 31 août 2002)

« Génétique des populations d'*Aedes aegypti* à Phnom Pehn (Cambodge) : utilisation de l'outil microsatellite ».

Stage niveau licence. Licence de biochimie, Université de Cergy Pontoise.

Publication issue de l'encadrement : n°11

**Christian FARGE** (12 décembre 2005 – 3 mars 2006)

« Typage de souches d'*Histomonas meleagridis* par isoélectrofocalisation ».  
Stage de BTSA ANABIOTEC, LEGTA de Saint Genis-Laval.

**Annabelle MENDES** (16 avril – 30 juin 2007)

« Etude de la variabilité génétique d'*Histomonas meleagridis* : recherche de marqueurs microsatellites et typage de souches parasitaires par l'étude d'isoenzymes ».  
Stage DUT Biologie appliquée option agronomie, IUT A, Université Claude Bernard LYON 1.

**Elise RENIER** (mai 2010 – septembre 2010)

« Mise au point de marqueurs microsatellites sur la tique *Amblyomma variegatum* »  
Stage de BTSA ANABIOTEC, LEGTA de La Roque, Rodez.

**Antony CHUNG YOU CHONG** (3 mars - 31 juillet 2014)

« Etude de la structure génétique d'*Amblyomma variegatum*, tique vectrice d'*Ehrlichia ruminantium* à Madagascar »  
Licence professionnelle Biologie Analytique et Expérimentale, IUT Montpellier -Sète.

**BALMEFREZOL Anastasia** (avril - juillet 2016)

« Mise au point de marqueurs microsatellites pour l'étude de la structuration génétique des populations de tiques *Amblyomma hebraeum* du Zimbabwe ».  
IUT de Colmar, Département Génie Biologique.

**TABOURIN Laura** (avril – juin 2017)

« Cartographie de la diversité cryptique du complexe *Culicoides obsoletus sensu lato* (Diptera : Ceratopogonidae) en Europe et comparaison de tests d'identification moléculaires sur cette diversité ».  
DUT Génie Biologique options ABB, Toulon.  
Publication issue de l'encadrement : n°32

**POUJOL Léa** (juillet – août 2018)

« Taxonomie moléculaire et étude de la diversité cryptique au sein des *Culicoides* du groupe « Obsoletus », vecteurs majeurs de la fièvre catarrhale ovine en Europe ».  
BTSA ANABIOTEC, Lycée Frédéric Bazille - Agropolis, Montpellier.  
Publication issue de l'encadrement : n°32

**DE WAVRECHIN Maïa** (mai – août 2019)

« Etude de la dispersion de *Culicoides obsoletus* : réalisation d'un jeu de données moléculaires ».  
BTSA ANABIOTEC, Lycée Frédéric Bazille - Agropolis, Montpellier.  
Publication issue de l'encadrement : n°33

#### 1.4. Autres encadrements diplômants

**Anne-Sophie LEROUX** (19 février – 6 avril 2007)

« Etude de la variabilité génétique d'*Histomonas meleagridis* à l'aide de marqueurs microsatellites »  
Stage BTA Transformation option Laboratoire d'analyse (niveau IV), Lycée Technique Privé « Les Mandailles », Chateauneuf de Galaure.

## 2. Formation et transfert de compétences pour les partenaires

### 2.1. Enseignement universitaire

**Avril 2001.** Institut National Agronomique Paris Grignon. UV d'entomologie du **Diplôme d'Agronomie Générale**. Journée sur le thème de la transmission vectorielle et des maladies parasitaires.

**Octobre-novembre 2001.** Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques, Université Paris V. Encadrement des étudiants durant les travaux pratiques de parasitologie de **4<sup>ème</sup> année des études de pharmacie** (21 h).

**Avril 2009.** « Les Tiques et leur rôle pathogène pour l'homme et les animaux ». **Module Biologie et contrôle des vecteurs. Ecole doctorale SIBAGHE** (Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosciences, Environnement) (3h).

**Septembre 2009.** « Tiques et maladies transmises ». **Master International d'Entomologie médicale et vétérinaire (M2)**. Universités Montpellier 2, Abomey Calavi, l'IRD, L'IRSP, CRC-Cotonou. (3h)

**Octobre 2009.** « Tiques et maladies transmises ». **Master Elevage dans les Pays du Sud : Environnement, Développement (M2)**. Universités Montpellier 2, CIRAD. (3h).

**Avril 2010.** « Les Tiques et leur rôle pathogène pour l'homme et les animaux ». **Module Biologie et contrôle des vecteurs. Ecole doctorale SIBAGHE** (Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosciences, Environnement) (3h).

**Octobre 2010.** « Tiques et maladies transmises ». **Master Elevage dans les Pays du Sud : Environnement, Développement (M2)**. Universités Montpellier 2, CIRAD. (3h).

**Avril 2011.** « Les Tiques et leur rôle pathogène pour l'homme et les animaux ». **Module Biologie et contrôle des vecteurs. Ecole doctorale SIBAGHE** (Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosciences, Environnement) (3h).

**Octobre 2009.** « Tiques et maladies transmises ». **Master Elevage dans les Pays du Sud : Environnement, Développement (M2)**. Universités Montpellier 2, CIRAD. (3h).

**Juin 2013.** « Les Tiques et leur rôle pathogène pour l'homme et les animaux ». **Module Biologie et contrôle des vecteurs. Ecole doctorale SIBAGHE** (Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosciences, Environnement) (3h).

### 2.2. Autres enseignements et transferts de compétences

**2000 et 2002.** Enseignements et formation **Cours d'entomologie médicale** 2000 et 2002 Institut Pasteur Paris. Travaux pratiques de génétique des populations : les microsatellites chez *Aedes aegypti* (deux demi-journées par session).

**Mars 2010. Transfert de technologie aux partenaires du projet DIGEERAV** (cf p. 22). Organisation de sessions théoriques et d'ateliers pratiques. Concernant la partie théorique j'ai animé des sessions sur la phylogéographie de la tique *A. variegatum* et les principes et intérêt de la génétique des populations en entomologie médicale. J'ai également organisé un atelier théorique et pratique sur les bases en biologie moléculaire (Extraction d'ADN, dosage, amplification PCR).

**18-22 juillet 2009.** Atelier régional de formation sur la fièvre de la Vallée du Rift (FVR) et l'influenza aviaire hautement pathogène (IAHP) au Maghreb, Alger, Algérie, organisé par la FAO. Animation de la

session « **Entomologie appliquée à la Fièvre de la Vallée du Rift** » (6 heures), dispensées à un public de vétérinaires tunisiens, algériens, marocains et mauritaniens.

### 3. Evaluation de la recherche et expertise

#### 3.1. Comités et jurys de thèse

**Participation en tant qu'examineur au jury de thèse** de Magalie RENE-MARTELLET « Etude du rôle vecteur de *Rhipicephalus sanguineus s.l.* dans la transmission des babésioses canines en France : prévalence parasitaire, diversité génétique des vecteurs et épidémiologie », Université Claude Bernard Lyon 1, 15 mars 2013.

**Participation au comité de thèse** de Guillaume MINARD « Métagénomique fonctionnelle et rôle du microbiote dans les capacités invasives et adaptatives du moustique tigre *Aedes albopictus* », Université Claude Bernard Lyon 1, octobre 2013.

**Participation en tant qu'examineur au jury de thèse** de Xiangye LIU « Identification of *Ixodes ricinus* female salivary glands factors involved in *Bartonella henselae* transmission », Université Paris-Est, 15 novembre 2013.

**Participation en tant qu'examineur au jury de thèse** d'Elsa QUILLERY « Développement de marqueurs génétiques (SNPs) à partir du génome de la tique *Ixodes ricinus* pour l'étude de la structure génétique de ses populations à l'échelle du paysage », Université Nantes Angers Le Mans, 19 décembre 2013.

**Participation au comité de thèse** de Nidia CANGI "Genetic and phenotypic characterization of *Ehrlichia ruminantium* strains in the ticks *A. hebraeum* and *A. variegatum* collected from domestic and wild ruminants in Mozambique", Université des Antilles et de la Guyane, juin 2014 et juin 2015.

**External Examiner pour la thèse** de Kelly BENNETT « Evolutionary processes generating African biodiversity; a case study on *Aedes* mosquitoes », Université de Manchester, Royaume-Uni, 24 novembre 2015.

**Participation au comité de thèse** de Mame Thierno BAKHOUM « Phylogénie, taxonomie et écologie des espèces de *Culicoides* Latreille (Diptera : Ceratopogonidae) en région Afrotropicale », Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement (AgroParisTech), septembre 2016.

**Participation en tant qu'examineur au jury de thèse** de Pedro Victor POLI DA SILVA PESTRE « Combiner la variation génétique et les modèles de distribution des espèces pour mieux comprendre leur histoire évolutive et améliorer les projections de redistribution en contexte de réchauffement climatique », Université de Picardie Jules Verne, 29 janvier 2021.

#### 3.2. Autres activités d'évaluation et d'expertise

2007. Participation rédaction du **rapport d'expertise pour l'EFSA** : Nitu Pages N., Huber K., Cipriani M., Chevalier V., Conraths F.J., Goffredo M., Balenghien T. Scientific review on mosquitoes and mosquito-borne diseases (CFP/EFSA/AHAW/2007/2)

2009. **Atelier régional de formation sur la fièvre de la Vallée du Rift (FVR) et l'influenza aviaire hautement pathogène (IAHP)** au Maghreb, Alger, Algérie, organisé par la FAO. Elaboration de recommandations concernant la surveillance et la lutte contre les vecteurs de la FVR en Afrique méditerranéenne.

Participation au groupe de travail « Collections Vivantes » (2013) et organisation scientifique de la journée thématique « Tiques et maladies à tiques : impacts en santé humaine et vétérinaire » (Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 20 Mai 2015) pour le **Centre National d'Expertise des Vecteurs (CNEV)**.

2015 Expert externe pour le programme « **Allocations de recherche pour une thèse au Sud (ARTS)** », IRD.

2019 Evaluation de **projet équipement, projets DIM1HEALTH** investissements 2019, Ile de France.

2021 Evaluation de projet pour la **Deutsche Forschungsgemeinschaft** (Fondation allemande pour la recherche).

**Membre de de jurys de recrutements :**

- 2016 Technicien en expérimentation animale, INRAE
- 2017 Assistant.e Ingénieur.e en biologie moléculaire, IRD
- 2020 Technicien en expérimentation animale Elevage d'insectes, conduite d'expérimentations et d'analyse, INRAE

**Relectrice** pour des articles en parasitologie et entomologie médicale et vétérinaire pour les journaux suivants : American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Infection, Genetics and Evolution, Journal of Parasitology, Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Molecular Ecology, Parasites & Vectors, Parasite, Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux, Tropical Biomedicine.

## Coordination et participation à des projets de recherche

---

**Projet DIGERAAV, Introduction et endémisation de la cowdriose dans les îles de l'Océan indien : étude de la diversité génétique d'*Ehrlichia ruminantium* et de sa tique vectrice *Amblyomma variegatum*.** Centre de Recherche et de Veille sur les maladies Emergentes dans l'Océan Indien, 1er appel pour des projets de recherche sur les maladies infectieuses émergentes transmises par des vecteurs arthropodes dans la zone géographique de l'Océan Indien (janvier 2008). Mars 2009-mars 2011. 152 000 € dont la part Cirad/INRA 45 000 €

Partenaires : Cirad, INRA, UMR CMAEE, France (coordination) ; INRA / ENVA / AFSSA / UPVM, UMR BIPAR, France ; DRZV/FOFIFA, Madagascar ; CIRAD, La Réunion, GRDSBR, La Réunion ; DSV, Mayotte ; INRAPE (CNDRS), Union des Comores.

Activités et responsabilités : chercheur, montage et rédaction de la réponse à l'appel d'offre, coordination des activités de recherche, encadrement scientifique, gestion administrative et financière.

Publications issues du projet : n°20, 25.

**Projet Chercheur d'avenir, région Languedoc Roussillon obtenu par Jérémy Bouyer (Cirad, UMR CMAEE), Risque d'émergence des maladies animales exotiques à transmission vectorielle en Europe : Impacts relatifs des facteurs génétiques et environnementaux sur la compétence vectorielle.** Jan 2012-Jan 2015, budget total : 50 000€

Partenaires : Cirad, France (coordination).

Activités et responsabilités : chercheur.

Publication issue du projet : n°30

**Projet Vmerge, Integrative and innovative research for improving surveillance and control of emerging vector-borne diseases of food animals in Europe and neighbour countries, FP7.** Fév 2014-Déc 2016, budget total : 3 900 000€ dont la part Cirad 513 000€

Partenaires : Cirad, France (coordination), 16 partenaires représentant 13 pays.

Activités et responsabilités : chercheur, encadrement scientifique de doctorant

Publications issues du projet : n° 21, 22, 23.

**Projet PALE-Blu « Understanding pathogen, livestock, environment interactions involving bluetongue virus », H2020,** 2017-2020, budget total : 6 000 000€ dont la part Cirad 333 000 €

Partenaires : Université de Nottigham (coordination) et 18 partenaires européens et internationaux

Activités et responsabilités : chercheur, encadrement scientifique de doctorant

Publications issues du projet : n° 32, 33.

**Projet CC-EID Climate change and the risk of emergence of wildlife-borne infectious diseases in agricultural and forest landscapes, metaprogramme INRA ACCAF.** 2014- 2016. Budget total : 50 000€

Partenaires : 8 UR et UMRs INRA et trois partenaires privés.

Activités et responsabilités : chercheur, collectes mensuelles de tiques sur le terrain.

**Projet Infravec2, Research capacity for the implementation of genetic control of mosquitoes -2, H2020 INFRAIA.** Mars 2017- Juin 2022, budget total 10 M€ dont 226 K€ pour le Cirad.

Partenaires : Institut Pasteur, France (coordination) et 24 partenaires européens et internationaux

Activités et responsabilités : **Principal Investigator (PI) pour le Cirad**, montage et rédaction de la réponse à l'appel d'offre, définition et à l'élaboration du budget des Trans National Access (TNA) distribués par le Cirad dans le cadre de ce projet, relation avec les partenaires, la gestion administrative de la délivrance des ressources (accueils, MTA, envois...) et la gestion financière du projet en relation avec les services du Cirad.

**Projet ISIDORE, Research infrastructure services for rapid research responses to COVID-19 and other infectious disease epidemics, HORIZON-RIA.** 36 mois, budget total 21 M€.

Partenaires : 156 partenaires constitués en 6 réseaux d'infrastructures financés par l'UE, un réseau de surveillance à financement national, 10 infrastructures de recherche européennes (ESFRI), coordination par l'ESFRI ERINHA (European Research Infrastructure on Highly Pathogenic Agents).

Activités et responsabilités : **PI pour le Cirad**, définition et à l'élaboration du budget des Trans National Access (TNA) distribués par le Cirad dans le cadre de ce projet, relation avec les partenaires, la gestion administrative de la délivrance des ressources (accueils, MTA, envois...) et la gestion financière du projet en relation avec les services du Cirad.

**Projet Holis-Tiques, *Hyalomma marginatum* en région Occitanie : étude d'une invasion biologique en cours et des risques associés, Défi clé « Risques infectieux et vecteurs – Occitanie » (RIVOC), Région Occitanie.** Janvier 2022 -Janvier 2025, Budget total : 170 000€

Partenaires : INRAE, UMR ASTRE (T. Pollet) (coordination), partenaires en région Occitanie (UR CEFS INRAE, Ecole nationale vétérinaire de Toulouse, Fédération Régionale des Chasseurs en Occitanie, Genotoul, Toulouse, Laboratoires vétérinaires départementaux en Occitanie) et au niveau national (UMR BIPAR, Maisons-Alfort ; UMR BIOEPAR, Nantes).

Activités et responsabilités : chercheur, participation au montage et à la rédaction de la réponse à l'appel d'offre, encadrement scientifique d'étudiant en master et doctorant.

# Animation et gestion de la recherche

---

## 1. Plateforme insectarium de Baillarguet

### 1.1. Responsable du suivi scientifique et technique de la plateforme

L'UMR ASTRE dispose d'un large éventail d'infrastructures de recherche incluant des installations sécurisées (laboratoire P2 et P3), d'animalerie et d'insectarium. L'unité dispose également d'une plateforme de diagnostic, étant laboratoire de référence au niveau national (DGAI) et international (OIE, FAO) pour plusieurs maladies.

Pilotée par les UMR ASTRE et INTERTRYP, la plateforme insectarium de Baillarguet (<https://www.vectopole-sud.fr/plateformes/insectarium-de-baillarguet/>), localisée sur le site du Cirad, est un laboratoire d'une surface de 112 m<sup>2</sup>, conçu pour héberger et élever diverses espèces d'arthropodes vecteurs ou non. La construction, financée dans le cadre des CPER 2007-2012 (4 M€) soutenue par l'Etat et la Région, a été achevée en 2014. Depuis le début de ce projet, j'ai assuré la correspondance entre les services techniques et les futurs utilisateurs pour la construction de ces locaux. Depuis 2013, j'ai été nommée « responsable du suivi scientifique et technique de l'insectarium » pour notre unité en binôme avec Sophie Ravel de l'UMR INTERTRYP. Cette fonction implique notamment :

- La coordination des activités de recherche et de développement liées aux élevages.
- La définition des bonnes pratiques et procédures d'utilisation de cette zone et suivi de la qualité des élevages.
- L'organisation de l'allocation des salles de l'insectarium et identification des besoins en matériel.
- D'être personne contact avec l'extérieur pour la valorisation et l'utilisation des élevages.
- La formation théorique et pratique des utilisateurs, relative aux activités de la zone insectarium.
- L'étude des coûts complets d'utilisation de la plateforme en interne et en externe réalisée chaque année

### 1.2. Membre du comité exécutif Vectopole Sud et du bureau exécutif EMERG'IN

L'UMR ASTRE avec la plateforme insectarium de Baillarguet est partenaire du réseau Vectopole Sud (<https://www.vectopole-sud.fr/>). Faisant suite au Réseau Montpelliérain sur les Vecteurs et les Maladies Emergentes (RMVME), créé en 2010 et renommé « réseau Vectopole Sud » depuis juillet 2017. Ce réseau montpelliérain, sur les arthropodes d'intérêt médical, vétérinaire et agricole, rassemble cinq institutions de recherche et d'enseignement supérieur : le Cirad, le CNRS, INRAE, l'IRD, l'Université de Montpellier et le principal opérateur public français de démoustication, l'EID Méditerranée. L'ANSES a également un de ses laboratoire associé au réseau.

L'objectif de ce réseau est de mutualiser les infrastructures et les compétences pour innover dans la lutte contre les ravageurs de cultures et les vecteurs de pathogènes, responsables de maladies infectieuses humaines ou animales. Les équipes de recherche intégrées à ce réseau mènent des activités de recherche et de formation se situant à de multiples interfaces entre biologie et santé, écologie et environnement, évolution et médecine. Ce réseau regroupe plus de 400 chercheurs et techniciens de cinq laboratoires appartenant aux communautés scientifiques de Montpellier Université d'Excellence (MUSE) et d'Agropolis International.

En tant que responsable de plateforme, je suis membre du comité exécutif du Vectopole Sud qui est la structure opérationnelle en charge de la mise en œuvre des activités du réseau. Celui-ci a pour mission de veiller à la coordination des stratégies scientifiques et de la politique partenariale des unités constitutives du réseau, d'élaborer les stratégies de réponses coordonnées aux appels d'offre, d'élaborer et faire appliquer la charte des utilisateurs des plateformes, de rédiger le rapport annuel synthétique d'activité du réseau et d'organiser les séminaires scientifiques.

La plateforme insectarium est également membre d'EMERG'IN (<https://www.emergin.fr/>), Infrastructure Nationale de Recherche pour la lutte contre les maladies infectieuses animales émergentes ou zoonotiques par l'exploration *in vivo*. EMERG'IN a pour but de doter la France d'un instrument de coordination nationale afin d'accroître les connaissances sur les maladies infectieuses animales émergentes et proposer des solutions de diagnostic et de contrôle de ces maladies. Il permet de constituer une Force de Réaction Rapide face aux émergences infectieuses. EMERG'IN propose des ressources et des savoir-faire issus de cinq plateformes d'infectiologie expérimentale d'INRAE, de l'ANSES et du CIRAD, dotées de laboratoires et animaleries en confinement adaptés aux recherches en infectiologie. Ce réseau permet de développer des partenariats public-privé dans le secteur du diagnostic et du médicament vétérinaire ainsi que dans le secteur des innovations pour le contrôle des maladies infectieuses.

### 1.3. Point focal des projets Infravec2 et ISIDORe

La plateforme insectarium de Baillarguet est partenaire du projet européen Infrastructures INFRAVEC2 (call H2020-INFRAIA-2016-1), initiative ayant pour but de relier les installations européennes modernes au cœur de la recherche, de faire avancer les connaissances dans le domaine de la biologie et du contrôle des arthropodes vecteurs d'intérêt en santé humaine et vétérinaire et de faciliter l'accès à ces ressources pour les chercheurs et les entreprises en offrant un accès totalement gratuit à des produits et services, pour la recherche sur les insectes vecteurs de maladies humaines et animales, y compris les moustiques, d'autres insectes (phlébotomes, glossines...) mais aussi des tiques (<https://infravec2.eu/>). Le projet ISIDORe, Research infrastructure services for rapid research responses to COVID-19 and other infectious disease epidemics (HORIZON-RIA) a été accepté en août 2020 et permettra de proposer des activités similaires à celles d'INFRAVEC2 (cf p22).

## 2. Management de proximité et participation à la direction d'unité

### 2.1. Co-animation du Collectif Vecteur

Bien que structurée scientifiquement autour de trois axes scientifiques, l'UMR ASTRE est organisée de manière opérationnelle en huit collectifs ressources présents dans différentes zones géographiques. Chaque collectif ressource a un ou deux référent/animateur (responsable hiérarchique ou non) qui est le point focal du canal d'information entre les collectifs et la direction. Depuis fin 2016, j'assume l'animation du collectif Vecteur en binôme avec Thierry Baldet (Cirad) et depuis septembre 2019 en binôme avec Claire Garros (Cirad).

En novembre 2021, le Collectif Vecteurs (<https://umr-astre.cirad.fr/recherche/collectifs/vecteurs>) regroupait 18 agents de l'UMR ASTRE travaillant sur des thématiques ou modèles d'entomologie médicale et vétérinaire. Ces agents sont localisés à Montpellier, à la Réunion, en Guadeloupe, en Autriche, au Maroc et Cambodge. Il s'agit de 14 cadres (dont trois agents INRAE), 3 non-cadres (Cirad), un CDD technicien.

Le collectif anime, partage et intègre les plateformes ressources de Baillarguet (laboratoire, insectarium). Ce collectif, en reconnaissant les spécificités de l'entomologie médicale et vétérinaire,

permet de mieux répondre à des questions intégrées et complexes en écologie vectorielle et épidémiologie des maladies à transmission vectorielle. Le collectif a pour mission de répondre aux enjeux majeurs pour la prévention, la surveillance et le contrôle des maladies à transmission vectorielle. Plus concrètement, ses objectifs sont de caractériser la bio-écologie des arthropodes vecteurs, comprendre l'épidémiologie des maladies à transmission vectorielle et de développer des outils de surveillance et de lutte. Les principaux modèles d'étude sont des arthropodes vecteurs d'intérêt en santé animale et humaine sont des arthropodes hématophages d'intérêt majeur en santé animale ou humaine : culicoïdes, moustiques, tiques dures et tiques molles ainsi que glossines.

Dans ce cadre, j'assure le lien entre le collectif et les infrastructures insectarium de l'unité. Je m'implique dans le management du personnel du collectif travaillant sur la plateforme. J'assure en binôme avec Claire Garros l'animation des réunions du collectif.

Au titre de l'animation du collectif, j'ai intégré le collège de direction (CODIR) de l'unité depuis 2016, comprenant l'ensemble des animateurs/responsables de collectifs, des Axes et des Grands défis (19 membres au total). Celui-ci constitue un espace d'information, d'échanges et de décision sur les orientations de l'Unité. Les membres du CODIR sont en charge de collecter les informations à faire remonter à la cellule de direction et de relayer les informations diffusées lors des réunions dans leurs collectifs.

## 2.2. Chargée de mission INRAE au sein de l'UMR ASTRE

L'unité ASTRE compte actuellement 156 agents dont 96 personnels permanents en activité. Parmi les membres permanents, l'unité compte 10 agents INRAE, un directeur de recherche INRAE, 4 chargés de recherche INRAE et 5 Ingénieurs et Techniciens, les autres agents de l'unité étant employés par le Cirad. Ce déséquilibre des effectifs avait généré par le passé un manque de visibilité de la tutelle INRAE dans l'unité, une absence de culture d'UMR ainsi qu'un certain malaise pour une partie des agents INRAE, notamment en lien avec une discordance entre les missions qui leur avait été confiées et les critères d'évaluation INRAE. C'est pourquoi la direction de l'UMR ainsi que celle du département Santé Animale (SA) d'INRAE m'ont demandé d'assurer une mission de référente INRAE au sein de l'UMR.

Cette mission consiste à veiller à l'adéquation entre la stratégie du département SA et celle de l'unité et d'assurer une meilleure visibilité d'INRAE dans l'unité, à différents niveaux au sein de l'unité mais aussi au-delà et en particulier dans la communication vis à vis de l'extérieur.

De manière plus spécifique mes missions consistent à :

- Être chargée de missions INRAE auprès de la Direction d'unité, aider la directrice d'unité pour les démarches concernant INRAE, le suivi des dossiers et les demandes d'actions incitatives
- Avoir délégation pour représenter l'Unité aux réunions de DUs centre de Montpellier afin de faciliter le transfert d'informations
- Représenter ponctuellement l'Unité aux réunions de DUs du département Santé Animale.
- Être référent pour les agents INRAE, leur fournir les informations sur les procédures associées à INRAE et accompagner les agents dans leurs démarches administratives vis-à-vis d'INRAE.
- Participer à l'évaluation des agents INRAE :
  - Participer à la finalisation des entretiens annuels avec la DU, de manière à apporter un conseil par rapport au cadrage/référentiel d'INRAE en termes de missions et d'évolution de carrière.
  - Pouvoir être sollicitée pour un entretien à la fois en période d'entretien annuel mais aussi au cours de l'année.
  - Ces activités ne se substituent aux relations entre les agents INRAE et les responsables directs des agents
- Être correspondante communication de l'unité pour le centre INRAE de Montpellier

Déjà membre du collège de direction de l'UMR ASTRE au titre de l'animation du Collectif Vecteur, je siège également depuis 2019 au sein du Codir au titre de référente INRAE. Depuis septembre 2020, je siège dans la nouvelle cellule de direction de l'UMR ASTRE en tant que chargée de mission INRAE. Celle-ci est composée d'une directrice d'Unité (DU), de deux DU Adjoints (DUA) et de trois chargés de mission. Les deux autres chargés de missions couvrent les domaines des sciences humaines et sociales et les connaissances en relations internationales. Mon intégration en tant que chargée de mission INRAE au sein de la cellule de direction permet de garantir une vision stratégique partagée entre le Cirad et INRAE ainsi qu'une représentation d'INRAE au sein de la direction.

## Description des activités de recherche

---

### 1. Présentation de mes thématiques de recherche : qui sont-ils, d'où viennent-ils et où vont-ils ? Génétique des populations de vecteurs d'intérêt en santé.

Mes activités de recherche s'inscrivent dans le cadre large de l'entomologie médicale et vétérinaire, discipline qui se situe au point de rencontre entre la science des insectes et les sciences de la santé mais qui conduit à aborder nombre d'autres champs de recherche comme l'écologie, la systématique, la biologie animale, la génétique des populations, la microbiologie, l'épidémiologie, les sciences de l'agriculture et de l'élevage ou encore les sciences sociales et l'histoire.

Au cours de l'évolution, virus, bactéries et protozoaires ont noué des relations étroites et multiples avec les insectes et les acariens, relations évoluant dans un certain nombre de cas vers la transmission de pathogènes par ces arthropodes qui sont alors défini comme vecteurs. Je retiendrai dans ce manuscrit la définition telle qu'énoncée par (Rodhain and Perez 1985) qui définit comme vecteur « tout arthropode hématophage qui assure la transmission biologique active d'un agent pathogène d'un vertébré à un autre vertébré ». La transmission est dite biologique lorsqu'une partie du cycle de développement du pathogène a obligatoirement lieu à l'intérieur de l'insecte vecteur (Rodhain and Perez 1985). La transmission est considérée comme active lorsque le vecteur établit de lui-même le contact entre l'agent infectieux et l'hôte vertébré. Ce système vectoriel complexe composé par l'hôte vertébré, l'agent pathogène et l'arthropode vecteur est sous l'influence de facteurs environnementaux sans cesse fluctuants. Les changements climatiques et les modifications écologiques, en partie liés à la croissance démographique et aux activités humaines, en lien direct avec l'intensification de l'agriculture et de l'élevage contribuent aux modifications constantes des situations épidémiologiques des maladies à transmission vectorielle.

Dans ce contexte de changement global, on assiste depuis une trentaine d'années à l'émergence ou à la réémergence de maladies à transmission vectorielle à l'échelle mondiale (Kampen and Werner 2011, Kilpatrick and Randolph 2012). Les maladies à transmission vectorielle constituent un problème majeur en santé publique et vétérinaire. En plus de leur importance sanitaire, elles ont un coût économique significatif pour la société et sont un frein au développement des pays où elles sont en forte prévalence. De manière plus large, les invasions biologiques sont responsables d'importants déclin de la biodiversité, d'impacts sur le fonctionnement des écosystèmes, sur les services écosystémiques, la santé et le bien-être des personnes. Elles génèrent des pertes économiques ainsi que des dépenses liées à la gestion de ces invasions. Le coût moyen annuel de ces invasions au niveau mondial a été estimé à 26,8 milliards de dollars US, ce coût étant certainement fortement sous-estimés (Diagne et al. 2021).

Comprendre et prédire l'épidémiologie des maladies à transmission vectorielle repose sur une connaissance claire de la biologie fondamentale des organismes impliqués. Peu d'informations sont souvent disponibles sur la façon dont ces populations fonctionnent dans des conditions naturelles. Il est souvent très difficile d'étudier la biologie et l'écologie des populations de vecteurs par une approche directe, en effet des paramètres tels que la taille des populations, leurs modes de reproduction et de dispersion sont difficilement observables. Des approches indirectes de génétique des populations, utilisant des marqueurs moléculaires polymorphes, peuvent aider à combler cette lacune.

Les questions de recherches développées au cours de ma carrière visent à mieux comprendre comment se distribuent et se structurent les espèces avec un intérêt particulier pour des espèces vectrices et un déterminant qu'est la dispersion. Pour y répondre, j'ai développé des approches de taxonomie moléculaire, de phylogéographie et de génétique des populations sur trois grands modèles

d'étude, le moustique *Aedes aegypti* par les travaux réalisés au cours de ma thèse et de mon post-doctorat, les moucheron du genre *Culicoides* et les tiques dures des genres *Amblyomma* et *Hyalomma* depuis mon recrutement à INRAE (Figure 2).

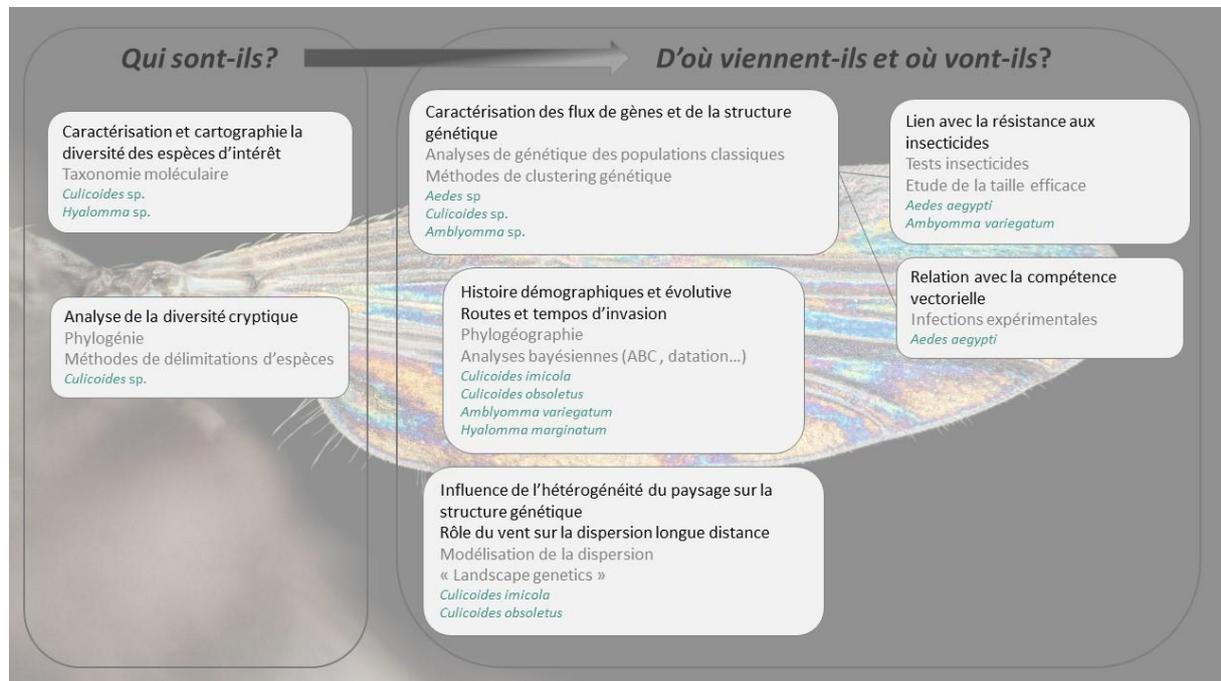


Figure 2 Représentation schématique des thématiques et questions de recherches traitées et modèles sur lesquels ces questions sont déclinées

### 1.1. Qui sont-ils ? Connaître et identifier les espèces vectrices

Les caractéristiques phénotypiques et génétiques des vecteurs d'agents pathogènes jouent un rôle clé dans la détermination de l'épidémiologie de la transmission. Des différences dans la biologie et l'écologie d'espèces proches peuvent jouer un rôle majeur dans la probabilité de transmission. On peut citer en exemple des différences de compétence vectorielle entre deux espèces, c'est-à-dire leur capacité à être infecté par des agents pathogènes et à les transmettre, ou le degré d'association avec un hôte spécifique (préférence d'hôte) (Harrup et al. 2015). L'identification des espèces vectrices, de leur diversité et de leur répartition, ainsi que la séparation précise de ces espèces est donc fondamentale pour comprendre l'épidémiologie des maladies. Par exemple, l'existence de races d'hôtes chez les tiques du genre *Ixodes* peuvent modifier les schémas de transmission des agents pathogènes et les risques d'exposition pour les humains (McCoy et al. 2013). Si les tiques forment des groupes naturellement associés à des hôtes, le risque d'exposition chez l'homme dépendra à la fois du degré de spécificité du vecteur pour chaque type d'hôte et des signaux que les différents groupes de tiques utilisent pour sélectionner leur hôte spécifique. Des analyses des infections de tiques de l'espèce *Ixodes uriae* par *Borrelia burgdorferi s.l.* ont indiqué des différences significatives dans les estimations de la prévalence locale entre différentes populations de tiques sympatriques (Gómez-Díaz et al. 2010). De même, des différences de compétence vectorielle vis-à-vis du virus de la bluetongue (BTV) ont été observées chez les *Culicoides* au Royaume-Uni. Deux populations présentant des taux d'infection au BTV plus élevés que prévu ont été détectées, l'une de *C. pulicaris s.l.* et la seconde de *C. obsoletus s.l.* La variabilité et la disparité des résultats obtenus en comparant toutes les populations analysées ont été interprétées par la présence d'espèces cryptiques non détectées au sein de ces populations (Carpenter et al. 2006).

Pour de nombreux groupes d'espèces d'arthropodes d'intérêt médical et vétérinaire, l'identification à l'espèce repose le plus souvent sur des critères morphologiques. Cette identification demande une expertise et repose souvent des opérations complexes comme des dissections sous loupe binoculaire ou des montages entre lame et lamelle observées au microscope. Leur maîtrise est affaire de spécialiste. Ceci est rendu encore plus compliqué par l'existence de complexes d'espèces cryptiques ou morphologiquement très proches, et par le fait qu'au sein de ces groupes, toutes les espèces ne sont pas toujours formellement décrites. De plus, les caractères morphologiques ne reflètent parfois pas les réelles relations phylogénétiques entre espèces.

Compte tenu de ces difficultés, il est devenu essentiel d'utiliser des méthodes complémentaires et alternatives pour résoudre les problèmes taxonomiques. Bien que les outils moléculaires puissent être plus coûteux et requièrent un équipement spécialisé, ils ont été utiles au cours de la dernière décennie pour approfondir les connaissances dans divers domaines de la biologie, allant de la systématique à l'écologie.

Le codage à barres de l'ADN (*DNA barcoding* ou *barcoding* moléculaire) est maintenant largement utilisé à travers le monde comme un outil rapide et efficace pour l'identification des espèces dans une grande variété de taxons du règne animal (Hebert et al. 2003). Cette méthode a également l'avantage de permettre l'identification des stades immatures ainsi que de spécimens partiellement détruits. Les performances du codage à barres de l'ADN peuvent varier au sein d'un même groupe de spécimens selon les régions géographiques et les écosystèmes (Elias et al. 2007). Le succès du *barcoding* moléculaire dépend de la distinction entre la divergence génétique intra- et inter-spécifique et est donc très dépendant de la question de savoir si les taxons identifiés constituent bien des espèces à part entière et de la manière dont ces espèces ont été définies.

Le concept d'espèce ne répond pas toujours à une définition unifiée et partagée (De Queiroz 2007). De l'inflation taxonomique se produit lorsque les chercheurs élèvent les sous-espèces ou les variants géographiques au niveau d'espèce en appliquant des concepts d'espèces alternatives. Cette subjectivité nuit à la stabilité taxonomique. Pour éviter ces écueils, des méthodes de délimitation et de description des espèces sont nécessaires. Un large éventail de nouvelles méthodes de délimitation des espèces a été récemment développé (Fujita et al. 2012), notamment basées sur la coalescence, visant à relier la variation moléculaire entre les organismes et la taxonomie en utilisant des modèles et des seuils de nature et de niveau de complexité différents. Ces méthodes peuvent contribuer à la clarification taxonomique de certains groupes d'espèces.

## 1.2. D'où viennent-ils et où vont-ils ? Caractériser et de comprendre les facteurs impliqués dans les processus d'invasions biologiques ou de dispersion des arthropodes

La distribution spatiale d'une espèce, mais aussi la structure génétique observée au sein de son aire de distribution, est la résultante de combinaisons complexes d'événements anciens et récents, évolutifs et démographiques, ayant conduit à la colonisation et à l'installation de groupes d'individus dans de nouveaux milieux. Elle est sous la dépendance forte des phénomènes de dispersion de cette espèce, c'est à dire les processus par lesquels des organismes vivants, se séparant (ou étant séparés) géographiquement d'une population d'origine, colonisent (ou recolonisent) un nouveau territoire.

Ces événements de dispersion sont sous la dépendance des modifications géomorphologiques et climatiques du milieu, qui modulent en continu les aires de distribution des espèces. De plus, en modifiant leurs environnements, les populations humaines contribuent aussi bien à modifier la distribution des espèces au sein de leurs aires natives, qu'à la dispersion des espèces hors de leur aire naturelle de répartition, à des échelles géographiques et à des vitesses sans précédent (McNeely 2006). La dispersion est également liée aux caractéristiques biologiques des espèces. Elle est ainsi fortement corrélée à la reproduction, la dispersion pouvant s'effectuer après la naissance et avant la

première reproduction, ou entre deux événements de reproduction. Cette phase mobile permet la mise en contact avec de potentiels partenaires sexuels, la recherche de ressources alimentaires ou d'un environnement favorable au développement de la progéniture ou possédant des facteurs environnementaux plus adaptés à l'espèce. Cette dispersion peut être active ou passive. La dispersion est dite active quand le mouvement est intentionnel, principalement guidé par la recherche de partenaires de reproduction ou pour le repas de sang par la marche, le vol ou la nage (Ronce 2007, Cote et al. 2017). Dans le cas de la dispersion passive, liée à des facteurs extrinsèques, l'individu dispersé n'est pas maître de la direction ou de l'intensité de dispersion. Les facteurs extrinsèques en cause peuvent être de différente nature comme les vents, les courants océaniques, des organismes hôtes ou encore lié aux activités humaines.

Le rôle du paysage dans lequel se disperse les espèces est important. En effet, les flux de gènes sont en effet plus ou moins contraints par les barrières naturelles ou artificielles limitant le déplacement des individus ou des espèces. Utilisant les méthodes de la géostatistique, de l'écologie et de la génétique des populations, une nouvelle discipline est née appelée la génétique du paysage. Cette discipline s'intéresse aux questions de migration, de dispersion et transferts de gènes et cherche à décrire l'influence des structures éco-paysagères (paysagères et environnementales) sur la structuration spatiale de la variabilité génétique (Manel et al. 2003).

Dans le cadre de l'étude des maladies à transmission vectorielle, il apparaît essentiel de caractériser et de comprendre les facteurs impliqués dans les processus de dispersion des arthropodes d'intérêt. En effet, les déplacements dans de nouveaux territoires d'hôtes, de réservoirs et d'espèces d'arthropodes vectrices avec les pathogènes transmis favorisent l'augmentation des contacts hôtes/vecteurs/pathogènes et contribuent à l'émergence ou la réémergence de maladies à transmission vectorielle d'intérêt médical ou vétérinaire. Une meilleure connaissance des facteurs historiques, démographiques et évolutifs ayant conduit à la distribution actuelle des espèces étudiées ainsi que des facteurs modelant leur distribution au sein de cette aire vont permettre (i) d'anticiper des phénomènes d'expansion de populations déjà installées, (ii) de prédire de nouvelles invasions biologiques et (iii) de mettre en place des stratégies de contrôle plus adaptées.

### 1.3. Présentation générale des modèles d'étude

Ce questionnement a été décliné sur un modèle d'intérêt en santé humaine, le moustique *Aedes aegypti* ainsi que sur plusieurs modèles d'étude d'intérêt vétérinaire et zoonotique, les mouches du genre *Culicoides* et les tiques dures des genres *Amblyomma* et *Hyalomma*.

#### 1.3.1. Les moustiques du genre *Aedes*

Au cours de mon DEA, de ma thèse et de mon post-doctorat j'ai travaillé sur le moustique *Aedes aegypti*. Cette espèce, d'origine africaine, à l'origine zoophile et inféodée aux environnements forestiers, s'est progressivement adaptée aux environnements anthropiques. Au gré des migrations humaines, elle s'est répandue vers le Nouveau Monde dès le XV<sup>e</sup> siècle et plus récemment, à partir du XVIII<sup>e</sup> siècle, vers l'Asie à la faveur du développement du commerce maritime. Très adaptées aux environnements anthropisés, les femelles *Ae. aegypti* pondent leurs œufs dans des gîtes artificiels (Figure 3) tels que des réservoirs d'eau, des pots des fleurs et des pneus usagés. Ces œufs ayant la capacité de subir de longues périodes de dessiccation (jusqu'à un an), cela permet à l'espèce de se maintenir au cours des périodes sèches mais facilite également son transport passif. Cette espèce pullule dans les environnements urbains où les systèmes d'adductions d'eau et de gestion de déchets sont défaillants, ce qui favorise la multiplication des gîtes larvaires potentiels. Dans ces conditions, les femelles qui piquent quasi exclusivement l'homme sont très souvent impliquées dans la transmission d'arbovirus et notamment des virus de la dengue, de la fièvre jaune, du chikungunya et du virus Zika.

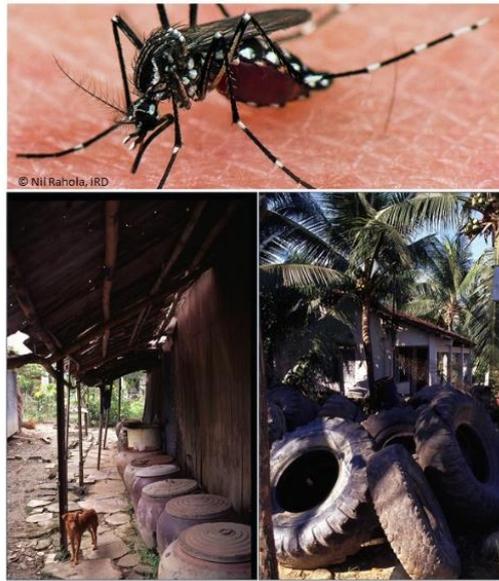


Figure 3 Femelle *Aedes aegypti* et gîtes larvaires artificiels en Asie du Sud-Est

Au cours de ma thèse, je me suis tout d'abord intéressée à la **structuration spatio-temporelle des populations de ce vecteur, en lien avec sa compétence vectorielle vis-à-vis des virus de la dengue en Asie du Sud-Est**. Au cours de mon post-doctorat je me suis penchée sur **l'impact sur la structure génétique, des conditions environnementales, les facteurs écologiques et les activités humaines, différenciant des populations selvatiques et domestiques d'*Ae. aegypti* au Sénégal**.

### 1.3.2. Les moucheron du genre *Culicoides*

Les culicoïdes sont de petits moucheron nématocères qui sont dans leur grande majorité hématophages (Figure 4). Les *Culicoides* sont présents dans quasiment toutes les régions du monde à l'exception des régions polaires et d'îles isolées des masses continentales (Borkent 2016). Les *Culicoides* sont présents sur un large gradient d'altitude, et certains spécimens ont été capturés jusqu'à 4 200 m au Tibet et dans les Andes (Garros and Balenghien 2017) montrant une forte plasticité biologique et écologique de ce genre (Werner et al. 2020).



Figure 4 Adulte de *C. nubeculosus* (Meigen) et comparaison de taille entre un moustique et un culicoïde

Ces moucheron piquent des mammifères y compris l'Homme, des oiseaux, mais aussi des reptiles. Les moucheron du genre *Culicoides* sont responsables de la transmission de différents virus d'intérêt vétérinaire et médical en région paléarctique et afrotropicale (Figure 5). Des émergences virales sont

régulièrement rapportées en lien avec les *Culicoïdes*. Au cours de l'année 2020, le virus Oropouche a été détecté pour la première fois en Guyane (source Institut Pasteur de Guyane) ainsi que l'émergence de foyer de peste équine en Thaïlande et en Malaisie (source Plateforme ESA). Dans la région ouest paléarctique, deux arboviroses des ruminants transmises par les *Culicoides* sont d'intérêt sanitaire et économique : la fièvre catarrhale ovine (FCO) et la maladie de Schmallenberg (SBV). Maladie considérée comme exotique pour la Méditerranée et l'Europe avant la fin des années 1990, la fièvre catarrhale ovine a émergé dans le bassin méditerranéen à partir de 1998 et, à partir 2006, en Europe de l'ouest provoquant une crise sanitaire sans précédent.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à *C. imicola*, espèce d'origine afrotropicale. Suite à l'apparition de nombreux foyers de FCO à partir des années 1990, il a été suspecté que ce moucheron ait subi une extension récente de son aire de répartition dans le bassin méditerranéen. Le travail sur cette espèce, réalisé de 2012 à 2015 dans le cadre d'une thèse que j'ai co-encadrée, a été **de retracer les routes et tempos d'invasion et de mettre en évidence le rôle du vent sur des événements de dispersion à longue distance de cette espèce**. Nous nous sommes aussi intéressés à **l'étude des dynamiques évolutives des populations à la limite de leur distribution géographique** qui peut renseigner sur les processus sous-jacents à leurs établissements dans de nouveaux milieux.

Ensuite, nous nous sommes focalisés, dans le cadre d'une thèse de doctorat (2017-2020) sur *C. obsoletus*, une espèce paléarctique autochtone impliquée dans la transmission de la FCO et du virus de Schmallenberg en zone tempérée. Après nous être intéressés à la **diversité cryptique au sein du complexe *Obsoletus***, nous avons **caractérisé les flux géniques de cette espèce à l'échelle de la France, en relation avec la dispersion active des *Culicoides* afin d'étudier l'influence de l'hétérogénéité du paysage sur la structure génétique de leurs populations**. A plus large échelle, nous avons voulu **caractériser l'influence des phénomènes de dispersion à longue distance sur la structure génétique des populations et également d'identifier les rôles des grandes barrières géographiques sur leur dispersion**.

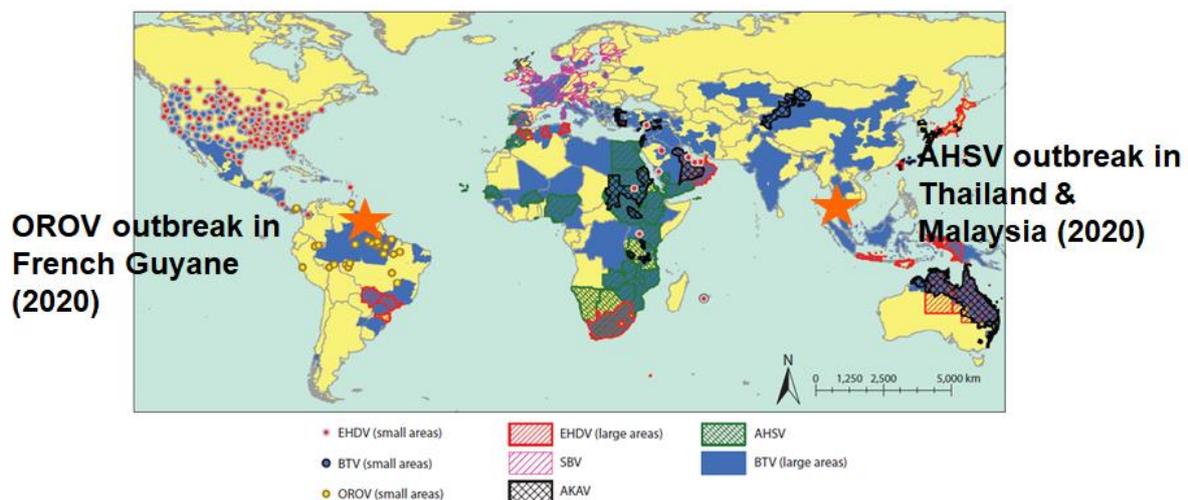


Figure 5 Distribution géographique des six virus principaux transmis par les *Culicoides* (d'après Purse *et al.* 2015).

### 1.3.3. Les tiques dures des genres *Amblyomma* et *Hyalomma*

*Amblyomma variegatum* (« tropical bont tick ») est une tique parasitant le bétail. Elle présente une très large distribution qui a été modélisée au fil du temps par différents facteurs comme la pluviométrie, son transport via le bétail ou les oiseaux, ou parfois par la compétition avec d'autres espèces de tiques. Elle est retrouvée dans une grande variété d'environnements et de climats allant de la forêt pluviale aux zones montagneuses plus tempérées, et des savanes aux steppes sahéliennes (Walker et al. 2003). Son aire de distribution couvre une partie de l'Afrique, son berceau d'origine, ainsi que certaines îles de l'océan Indien et de la Caraïbe (Figure 6). *A. variegatum* est un parasite majeur des bovins, des moutons et des chèvres. Les stases immatures peuvent infester de très nombreuses espèces de vertébrés (reptiles, oiseaux, petits et grands mammifères), mais avec une nette tendance à la monotropie compte tenu de la large proportion de stases immatures se gorgeant sur les ruminants domestiques (Morel 1981, Petney et al. 1987). Lors de fortes infestations, *A. variegatum* peut générer des baisses de productivité (pertes en lait et croissance réduite) et causer la destruction des trayons. Cette tique est également associée à la dermatophilose, affection bactérienne provoquant des lésions cutanées, aggravées en cas de forte infestation par les tiques qui diminuent l'immunité de l'hôte. Enfin, *A. variegatum* est un vecteur majeur d'*Ehrlichia ruminantium*, l'agent de la cowdriose (heartwater) qui touche les bovins, les ovins et les caprins et qui peut induire une très forte mortalité, allant jusqu'à 80% chez les animaux sensibles. Dans la partie orientale de l'Afrique Australe, le principal vecteur de la cowdriose est *A. hebraeum* (Figure xxx). Les tiques adultes parasitent préférentiellement les hôtes de grande taille tels que les bovins et les gros ruminants sauvages, en particulier les girafes, les buffles, les élans et les rhinocéros. Elles infestent également des moutons et des chèvres. Les stades immatures se nourrissent sur les mêmes hôtes que les adultes mais aussi sur les petites antilopes, le lièvre des buissons, la pintade de Numidie et les tortues. Plus rarement, cette espèce peut infester des rongeurs.

Le modèle *A. variegatum* m'a permis de de travailler **sur le rôle des activités humaines et notamment des mouvements de bétail domestique dans les phénomènes d'invasion**. Je me suis intéressée à **l'influence des tailles efficaces des populations de cette espèce en relation avec la résistance aux acaricides**. J'ai également étudié **l'influence de l'interface entre faune sauvage et bétail domestique sur la structuration d'*A. hebraeum***, espèce endémique d'Afrique Australe.

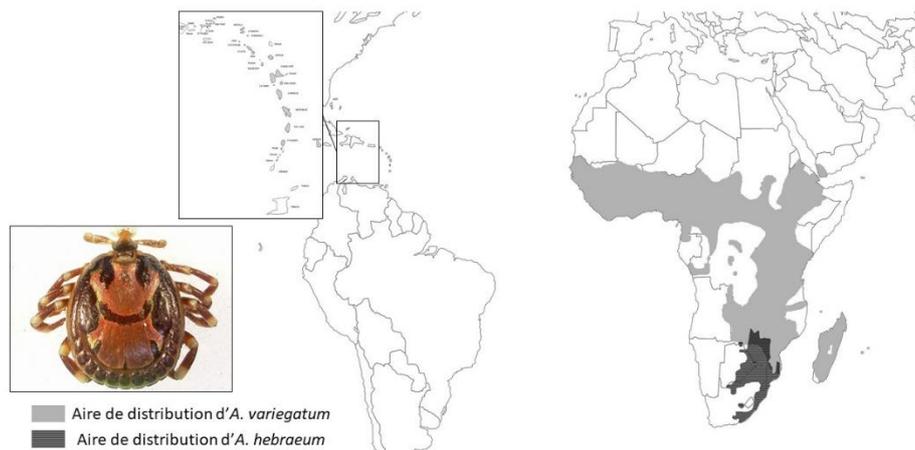


Figure 6 Mâle adulte *Amblyomma variegatum* et carte de distribution d'*A. variegatum* et d'*A. hebraeum* (d'après (Walker and Olwage 1987, Walker et al. 2003))

Enfin, depuis 2016, j'ai commencé à m'intéresser aux tiques du genre *Hyalomma* impliquées dans la transmission de plusieurs agents pathogènes humains et animaux en Eurasie et en Afrique. Endémique dans plusieurs pays méditerranéens, du Maghreb à la péninsule ibérique et de l'Italie à la Turquie, cette espèce était absente des régions du sud de la France jusqu'à 2015. Depuis cette date, *H. marginatum* s'est établie sur le littoral méditerranéen français, avec une aire de répartition qui ne cesse de s'étendre (Vial et al. 2016) (Figure 7).

*Hyalomma marginatum* est une tique à deux hôtes réalisant une génération par an dans la nature (Hoogstraal 1979). Les larves, qui infestent des petits vertébrés (lièvres et lapins, hérissons, oiseaux souvent présents au sol (comme les merles, les rouges-gorges ou les grives...), ne se détachent pas une fois gorgées mais subissent sur l'hôte, en quelques jours, une métamorphose à l'issue de laquelle les nymphes se refixent immédiatement à côté de l'exuvie dont elles viennent de sortir. Ce sont les nymphes, une fois gorgées, qui se détachent de leurs hôtes avant de subir au sol la métamorphose en adulte. Les adultes quant à eux ont une prédilection marquée pour les grands vertébrés : chevaux, bovins, ovins et caprins, mais aussi sangliers ou chevreuils (Stachurski and Vial 2018).

Cette tique revêt une grande importance en termes de santé humaine et animale. Elle est en effet vectrice du virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (FHCC), virus qui provoque chez l'homme des flambées de fièvre hémorragique virale sévère, avec un taux de létalité pouvant aller de 10 à 40%. Endémique en Afrique et en Asie, ce virus est considéré comme un agent pathogène émergent en Europe et affecte déjà plusieurs pays comme l'Espagne avec plusieurs cas humains dénombrés depuis 2016. *H. marginatum* est également vectrice de la bactérie *Rickettsia aeschlimannii*, responsable de fièvres boutonneuses et présente dans des pays d'Europe de l'Ouest comme la France, l'Espagne et le Portugal, mais aussi de *Babesia caballi* et *Theileria equi*, agents responsables des piroplasmoses équine. Toutefois, alors que jusqu'ici, seuls ces quatre agents pathogènes sont régulièrement mis en avant comme étant vectorisés par *H. marginatum*, il est fort probable que cette tique puisse porter et potentiellement transmettre une plus grande diversité d'agents pathogènes peu étudiés jusqu'ici (Estrada-Peña et al. 2018).

Plus spécifiquement, je développe actuellement une approche de phylogéographie sur *H. marginatum* considérée comme l'un des vecteurs majeurs du virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (CCHFv) pour **confirmer son introduction récente dans le sud la France et retracer ses voies d'introduction.**

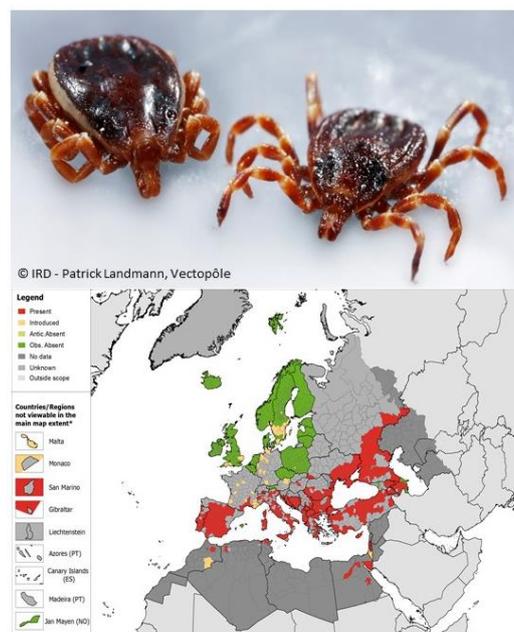


Figure 7 Mâle et femelle de *H. marginatum* et répartition connue de *H. marginatum* en Europe en 2021 (Source EFSA)

## 2. Travaux de recherche et principaux résultats

### 2.1. Recherches développées sur les moustiques de l'espèce *Ae. aegypti*

#### 2.1.1. Analyse spatiale et temporelle de la variabilité génétique d'*Ae. aegypti* au Sud Vietnam

C'est au cours de ma thèse que j'ai commencé à m'intéresser au mode de fonctionnement des populations de ce vecteur dans les conditions naturelles afin de mieux comprendre l'organisation génétique des populations et d'estimer les flux de gènes entre ces populations dans le but de mieux appréhender l'épidémiologie des maladies transmises et d'établir des stratégies de lutte adaptées.

Une étude de la variabilité génétique du vecteur a été initiée au Sud Vietnam à l'aide de marqueurs microsatellites nouvellement développés. Les résultats obtenus ont été comparés à une méthode largement éprouvée, les isoenzymes. Une analyse de la structure génétique ainsi que celle de la compétence vectorielle des populations ont été menées à une échelle spatiale (de niveau local, à Ho Chi Minh Ville et de niveau régional) et à une échelle temporelle (à différentes périodes de l'année).

L'étude spatiale a montré que le patron de différenciation génétique des populations diffère selon le niveau d'observation : (1) au niveau de la ville de Ho Chi Minh ville, ont été démontrés l'influence des pratiques de stockage d'eau et des densités humaines sur le niveau de différenciation génétique des populations de moustiques, ainsi que de la pression insecticide qui a été caractérisée par des tests de résistance aux insecticides (2) au niveau régional, lors d'une étude réalisée entre le Vietnam, le Cambodge et la Thaïlande, la différenciation génétique la plus faible a été observée entre les populations de moustiques de Ho Chi Minh Ville et de Phnom Penh, distants de 250 km, suggérant que le transport passif du moustique par l'homme est responsable des flux de gènes.

Une étude temporelle de la variabilité génétique d'*Ae. aegypti* à Ho Chi Minh Ville montre que la différenciation génétique, estimée en se basant sur le polymorphisme isoenzymatique, baisse à la saison des pluies et augmente de façon significative à la saison sèche. A l'intérieur d'un même échantillon, les fréquences alléliques aux loci microsatellites varient faiblement entre le début de la saison des pluies et le début de saison sèche. Cependant, la composition allélique change de façon importante entre ces deux saisons. De plus, la compétence vectorielle vis à vis du virus de la dengue 2 montre des variations au niveau des taux d'infection qui restent cependant stables et homogènes à la saison des pluies. Ce travail a ainsi permis de proposer un modèle de fonctionnement des populations d'*Ae. aegypti* dans l'espace et dans le temps. La dynamique d'expansion des virus de la dengue en relation étroite avec son vecteur, dépend de la composition génétique des populations de moustiques et leur évolution dans l'aire de répartition naturelle de l'espèce.

*Ces travaux ont été réalisés au cours de mon DEA et de ma thèse au sein de l'Unité d'Ecologie des Systèmes Vectoriels de l'Institut Pasteur à Paris. Publications n°1-8 ;10.*

#### 2.1.2. Diversité et structure génétique des populations domestiques et sylvatiques d'*Ae. aegypti* en Afrique de l'Ouest

L'épidémiologie de la dengue n'est pas bien comprise en Afrique de l'Ouest. Contrairement à l'Asie du Sud-Est où la transmission interhumaine est le plus souvent détectée, en Afrique de l'Ouest, la transmission sylvatique semble être prédominante. Toutefois, malgré des manifestations sylvatiques et la présence de moustiques vecteurs dans les zones urbaines, seuls quelques cas sporadiques ont été signalés pendant ou après ces amplifications virales sylvatiques, ceci étant corrélé à de rares isolements du virus de la dengue (DENV) sur *Aedes aegypti* (Zeller et al. 1992, Traore-Lamizana et al. 1994).

*Ae. aegypti*, est une espèce polytypique qui comprend deux formes principales se distinguant par leur morphologie, leur écologie, leur éthologie et leur génétique (Tabachnick and Powell 1979, Failloux et al. 2002) i. *Ae. aegypti aegypti* (Aaa), une forme de couleur claire qui se reproduit dans les environnements domestiques ou péri-domestiques et se trouve présente dans les zones côtières de l'Afrique de l'Est et de répartition cosmopolite, et ii. *Ae. aegypti formosus* (Aaf), une forme sombre qui se reproduit dans les trous d'arbres et parfois dans les trous de pierres, et se retrouve principalement en Afrique subsaharienne. Au Sénégal, des variations morphologiques et éthologiques ont été observées entre les populations d'*Ae. aegypti*, liées à leur localisation géographique et au type d'habitat. Une forme sylvatique est présente dans les forêts-galeries du sud du Sénégal. Elle a des tendances zoophiles et utilise les trous d'arbres comme sites de reproduction. Une forme domestique est retrouvée dans les villages de savane, les zones sahéliennes et les zones urbaines. Cette dernière forme est écologiquement similaire à *Ae. aegypti aegypti* et est très anthropophile. Morphologiquement, les deux formes que l'on trouve au Sénégal sont caractérisées par une couleur sombre, la forme "domestique" étant légèrement plus pâle

Dans cette étude, nous avons analysé, à l'aide d'allozymes, la diversité génétique et la structure des populations d'*Ae. aegypti* collectées dans différentes zones du Sénégal qui se distinguent par leurs caractéristiques écologiques. Les populations du Sénégal sont fortement structurées mais avec un faible niveau de différenciation génétique. Les *Ae. aegypti* des populations "domestiques" présentent une diversité génétique réduite et une différenciation génétique plus faible que les populations sylvatiques.

Les résultats de cette étude nous ont permis de formuler deux hypothèses. La première est que les populations domestiques d'*Ae. aegypti* pourraient avoir une origine sylvatique. Nos résultats montrant une nette persistance des flux génétiques entre les populations sylvatiques et domestiques, soutiennent cette hypothèse. Le processus de domestication pourrait avoir été associé à une série de changements morphologiques, comportementaux et démographiques, comme cela a déjà été signalé pour différentes populations au Burkina Faso (Wallis et al. 1983). La simplification génétique pendant la domestication peut se produire par des effets fondateurs suivis d'une compétition intraspécifique. En outre, lorsqu'une population nouvellement fondée est isolée de son origine sylvatique, on peut s'attendre à une nouvelle perte de variabilité génétique (Dujardin 1998). Ces constatations impliquent que les conditions environnementales, les facteurs écologiques et les activités humaines ont été les facteurs qui ont façonné la structure génétique des populations d'*Ae. aegypti* au Sénégal.

La deuxième hypothèse serait que la forme "domestique" pourrait être un hybride récent entre la forme *Ae. a. aegypti* domestique d'Afrique du Nord et la forme sylvatique *Ae. a. formosus* d'Afrique de l'Ouest, comme le suggère Tabachnick (Tabachnick 1991). Il suppose que la domestication n'est pas suffisante pour maintenir une population sympatrique distincte. Cette hypothèse pourrait expliquer le faible niveau de différenciation génétique observé au Sénégal et que la forme présente une couleur sombre comme la forme *formosus* mais qu'elle porte des taches blanches sur le premier tergite abdominal et montre une préférence trophique pour l'homme.

Ces travaux montrent bien que si les motifs des écailles sur les tergites sont en corrélation avec les différences génétiques en Afrique de l'Est (Tabachnick et al. 1979), ce n'est pas le cas en Afrique de l'Ouest. Ceci a été confirmé par d'autres études en Afrique de l'Ouest (Paupy et al. 2008, Sylla et al. 2009, Paupy et al. 2010, Moore et al. 2013, Xia et al. 2020), où, si la couleur de la cuticule est principalement noire, elle présente un continuum de motifs d'écailles pâles sur les tergites abdominaux. En outre, des études morphologiques et taxonomiques ont montré récemment que la classification d'*Ae. aegypti* en deux sous-espèces n'est pas valide au Sénégal, les populations présentant un polymorphisme morphologique au niveau intra-familial (Diouf et al. 2020). L'absence de barrières génétiques associées à l'habitat en Afrique soulève des questions intéressantes sur l'histoire évolutive d'*Ae. aegypti*, notamment sur celle liée aux processus de domestication et de son adaptation à l'homme et lorsque le changement d'habitat n'est pas lié à de la différenciation génomique (Xia et al. 2020). Une étude récente de génomique des populations (Dickson et al. 2017) a permis de

caractériser une forte différenciation génétique entre les populations d'*Aaa* du Sénégal et celles d'*Aaa* en dehors de l'Afrique, ce qui permet d'émettre l'hypothèse que de des taxons cryptiques d'*Ae. aegypti* pourraient exister en Afrique de l'Ouest. Les grandes différences génétiques observées se sont seraient accumulées sur une longue période suite à l'évolution de réarrangements chromosomiques (Dickson et al. 2016). L'existence d'espèces cryptiques d'*Ae. aegypti* pourrait avoir un impact négatif sur les efforts de lutte contre cette espèce. Il y a un donc un besoin de définir les distributions géographiques des réarrangements chromosomiques qui sont associés ces sous-espèces cryptiques d'*Ae. aegypti*.

*Ce travail a été réalisé dans le cadre de mon contrat post doctoral réalisé au sein de l'Unité de zoologie médicale de l'Institut Pasteur de Dakar et en collaboration avec ses équipes. Ce travail a été financé par le Programme spécial pour la recherche et la formation dans le domaine des maladies tropicales UNICEF/UNDP/World Bank/WHO (TDR) : A00398. Publication n°16.*

## 2.2. Recherches développées sur le modèle *Culicoides*

### 2.1.1. Expansion et colonisation du bassin méditerranéen par *Culicoides imicola* (Diptera : Ceratopogonidae)

*Culicoides imicola*, est une espèce d'origine afrotropicale, vecteur majeur du virus de la fièvre catarrhale ovine (FCO) sur l'ensemble de son aire de distribution. Suite à l'émergence de la FCO dans le bassin méditerranéen, les populations de *C. imicola* ont été découvertes dans des territoires où elles étaient considérées comme absentes, ce qui a alors conduit à l'hypothèse, largement partagée, que cette présence était la résultante d'une expansion récente de l'espèce. Le but de ce travail a été alors de caractériser les processus de colonisation du bassin méditerranéen par cette espèce.

Avant les années 2000, la FCO est considérée comme une maladie exotique à au bassin méditerranéen, avec seulement quelques incursions sporadiques au Portugal, dans le sud-ouest de l'Espagne, certaines îles grecques et à Chypre, zones où *C. imicola* est considéré comme présent (Mellor et al. 2009). A la fin des années 90, on voit apparaitre massivement des foyers de FCO dans des zones précédemment indemnes et dans lesquelles la présence de *C. imicola* n'avait jamais été vérifiée (Mellor and Wittmann 2002, Mellor et al. 2009). La communauté scientifique émet alors l'hypothèse d'une extension récente de l'aire de répartition de *C. imicola*, en lien avec les changements climatiques actuels, pour expliquer la situation épidémiologique dans le bassin méditerranéen. Les premiers travaux de phylogéographie, basés sur des séquences d'ADN mitochondrial, semblaient en cohérence avec cette hypothèse (Dallas et al. 2003, Nolan et al. 2008, Calvo et al. 2009). Ils montraient une structuration des populations de *C. imicola* entre l'est et l'ouest du bassin méditerranéen, identifiant des routes de colonisation en cohérence avec la circulation observée des différents sérotypes et mettaient en évidence une signature de colonisation récente pour les populations de la partie ouest du bassin méditerranéen. Par contre, une étude plus récente, basée sur des marqueurs microsatellites va en faveur d'un scénario de présence plus ancienne de cette espèce en Italie avec des flux de migrants réguliers depuis l'Afrique du Nord (Mardulyn et al. 2013) (Figure 8).

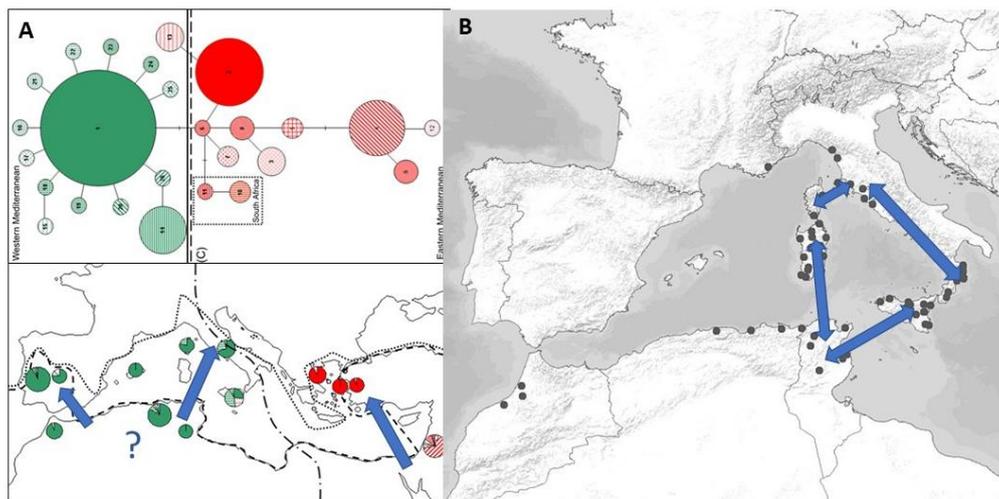


Figure 8 Hypothèses de colonisation du bassin méditerranéen par *C. imicola*. A : expansion récente vers le nord de l'aire de répartition de *C. imicola* à partir de deux ou trois sources génétiquement distinctes d'après (Dallas et al. 2003, Nolan et al. 2008, Calvo et al. 2009) ; B : présence ancienne de *C. imicola* en Italie avec une immigration récurrente en provenance d'Afrique du Nord d'après (Mardulyn et al. 2013)

Ceci nous a donc amené à nous interroger sur le statut invasif de cette espèce et à essayer de caractériser le tempo de colonisation de *C. imicola* dans le bassin méditerranéen, en relation avec les populations de la zone native de distribution de cette espèce (Afrique Subsaharienne et Moyen-Orient). Nous avons cherché à déterminer les facteurs démographiques, historiques et évolutifs ayant conduit à la répartition et à la structuration actuelle des populations de *C. imicola*. Ceci a été mené à différentes échelles : sur l'ensemble de l'aire de distribution actuelle de cette espèce, dans le bassin méditerranéen, et plus localement entre la France et l'Espagne. Pour cela, nous avons utilisé une approche intégrée, avec un échantillonnage représentatif de l'aire de distribution de l'espèce, une approche multi-loci combinant marqueurs mitochondriaux, gène nucléaire et marqueurs microsatellites. Les analyses ont fait appel à de la phylogéographie, de la génétique des populations classique, des analyses bayésiennes de type ABC permettant de tester des scénarios de colonisation et de la modélisation.

La diversité observée à partir des séquences mitochondriales et des marqueurs microsatellites montrent une plus forte diversité en Afrique subsaharienne que dans le bassin méditerranéen ce qui confirme l'origine afrotropicale de *C. imicola*. Les marqueurs mitochondriaux mettent en évidence quatre grands clusters génétiques différenciant les échantillons d'Afrique de l'Est et de l'Ouest et l'Est et l'Ouest du Bassin méditerranéen (Figure 9). Les relations entre les différents haplotypes (Afrique de l'Est et Est bassin méditerranéen et Afrique de l'Ouest/Ouest bassin méditerranéen) ne permettent pas d'exclure un scénario de colonisation du bassin méditerranéen avec deux routes distinctes.

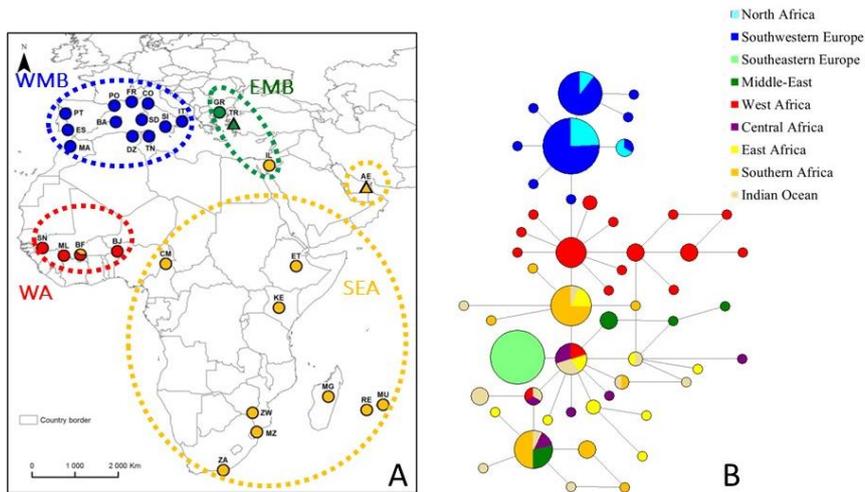


Figure 9 Clustering génétique des populations de *C. imicola* (WMB, western Mediterranean Basin, EMB, eastern Mediterranean Basin, WA, western Africa, SEA, southeastern Africa) (A) et réseau d'haplotypes (B) des séquences mitochondriales COI. La taille des cercles est proportionnelle aux nombres d'individus portant cet haplotype. Les couleurs représentent l'origine géographique des individus.

Le patron observé avec les microsatellites est un peu différent en Afrique, opposant un cluster centre-africain et un cluster sud-africain (Figure 10). Des signaux d'échanges génétiques passés ont été mis en évidence entre ces clusters qui pourraient s'expliquer par des contractions-expansions démographiques subies par les populations lors des épisodes glaciaires et interglaciaires du Pléistocène. Avec les marqueurs microsatellites, le scénario de colonisation le plus probable est en faveur d'un évènement d'introduction unique donnant le groupe centre-africain comme population source des populations méditerranéennes. Cet évènement serait consécutif aux périodes ayant permis l'humidification du Sahara à la fin du Pléistocène et créant des connections importantes entre la côte nord-africaine et le centre du continent.

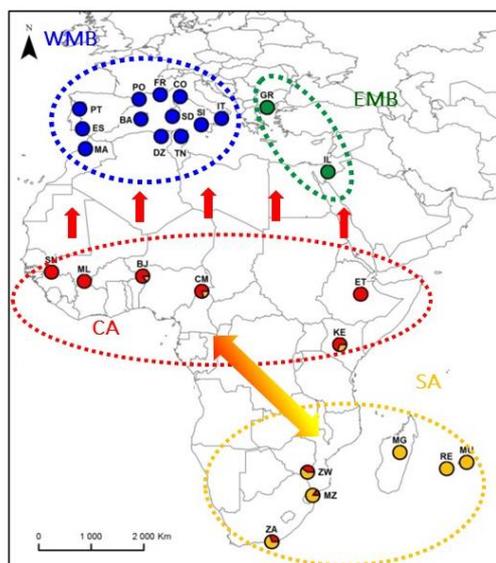


Figure 10 Clustering génétique des populations de *C. imicola* basé sur les données microsatellites (WMB, western Mediterranean Basin, EMB, eastern Mediterranean Basin, CA, central Africa, SA, southern Africa)

Au sein du bassin méditerranéen, on a vu précédemment que l'on retrouvait bien les groupe Est et Ouest bassin méditerranéens précédemment décrits. Ces populations auraient divergé au cours de l'Holocène. Les facteurs ayant conduit à cette divergence ne sont pas complètement compris mais il est possible que des facteurs environnementaux comme des barrières physiques, fragmentation des habitats liés à des évènements climatiques, aient conduits à cette différenciation. Au sein de la partie Ouest du bassin méditerranéen on observe deux clusters génétiques, l'un regroupant les populations du Maroc, du Portugal et de l'Espagne et l'autre l'Algérie, l'Italie et la France. Les analyses réalisées suggèrent que *C. imicola* aurait colonisé le sud-ouest de l'Europe via deux routes de colonisation depuis l'Afrique du Nord : du Maroc vers l'Espagne et le Portugal et de de l'Algérie vers la péninsule italienne et la France. Cette colonisation est ancienne, datée d'au moins 200 ans accompagnée d'évènements de migration récurrente.

L'ensemble de ce travail permet donc de proposer une nouvelle hypothèse expliquant la distribution actuelle de *C. imicola* dans le bassin méditerranéen (Figure 11). Cette hypothèse soutient une présence ancienne de *C. imicola* dans le bassin méditerranéen sur sa côte africaine et européenne. Ce qui infirme l'hypothèse classiquement admise d'une colonisation très récente dans le bassin méditerranéen. L'effort d'échantillonnage réalisé suite aux foyers de FCO n'aurait fait que révéler la présence de populations installées de plus longue date. Par contre une augmentation de la taille des populations observée dans l'Ouest méditerranéen en lien avec l'augmentation des températures auraient pu ainsi favoriser la transmission des différents sérotypes identifiés dans la zone.

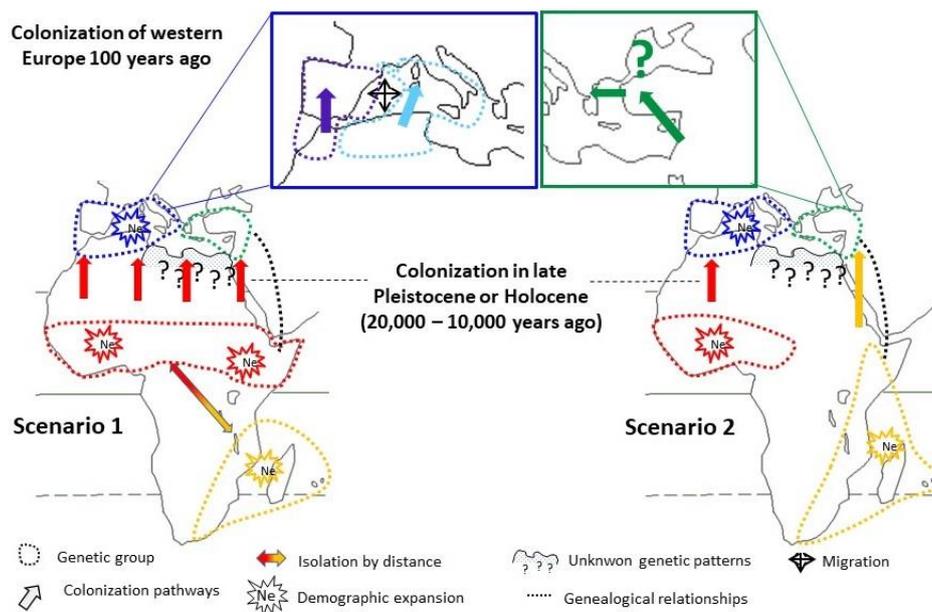


Figure 11 Scénarios permettant d'expliquer la diversité génétique et la distribution actuelles de *C. imicola*

A une échelle plus locale, des missions de surveillance entomologique ont montré à partir de 2008 l'observation répétée de *C. imicola* en France dans le département des Pyrénées-Orientales (Venail et al. 2012). Ceci laissait à penser qu'il existait un lien génétique entre ces populations et les populations déjà présentes en Catalogne (Sarto i Monteys et al. 2005). Une étude d'assignation génétique a été menée à l'aide marqueurs microsatellites et mitochondriaux qui montre deux groupes un groupe incluant les populations du Maroc, d'Espagne, du Portugal et des Baléares et un groupe incluant les populations d'Algérie de Sardaigne et de Corse, du Var et des Pyrénées-Orientales. L'hypothèse d'une remontée d'individus depuis la Catalogne n'est donc pas soutenue par l'analyse génétique (Figure 12).

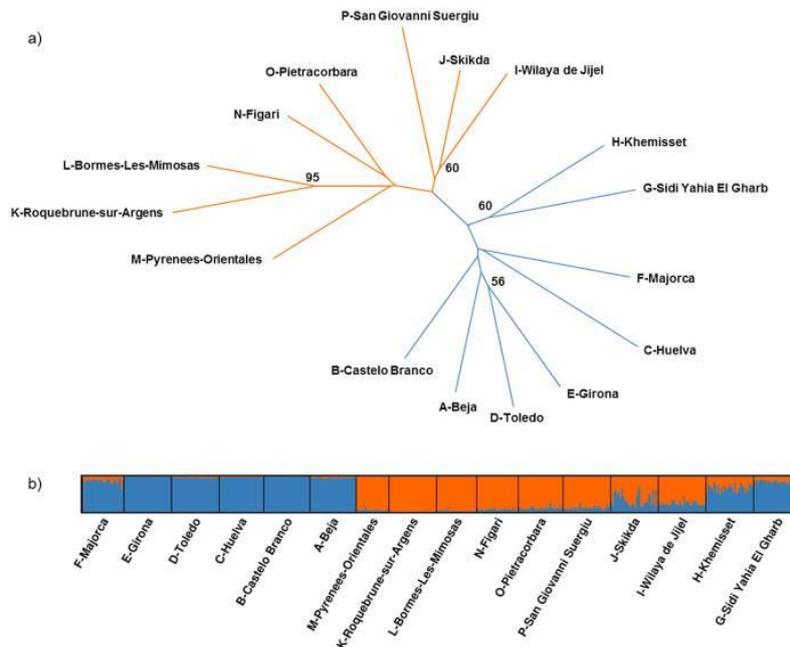


Figure 12 Arbre en neighbor-joining et résultats de clustering génétique obtenu à partir des données microsatellites pour les populations de *C. imicola*. (a) L'arbre en neighbor-joining est basé sur la distance génétique de Cavalli-Sforza & Edwards (Cavalli-Sforza and Edwards 1967). Les valeurs de bootstrap sont calculées sur 1 000 répétitions (seules les valeurs >50 % sont indiquées). (b) Chaque ligne verticale représente un individu, et chaque couleur représente un groupe. Les individus sont regroupés par lieu d'échantillonnage : Algérie (Skikda, Wilaya de Jijel), Baléares (Majorque), France continentale (Pyrénées-Orientales, Roquebrune-sur-Argens, Bormes-les-Mimosas), Espagne continentale [Girona (Catalogne), Tolède, Huelva], Corse (Figari, Pietracorbara), Maroc (Khemisset, Sidi Yahia El Gharb), Portugal (Beja, Castelo Branco), Sardaigne (San Giovanni Suergiu)

Les scénarios testés par la méthode ABC soutiennent une introduction depuis la Corse. La dispersion des *Culicoides* par les vents sur de longues distances au-dessus des masses d'eau est bien documentée (Sellers et al. 1977, Braverman and Chechik 1996). Des simulations mathématiques ont montré que des particules assimilées à des culicoïdes pouvaient avoir des trajectoires de vol passif porté par le vent depuis les côtes nord africaines, via les Baléares, jusqu'à la côte au niveau de la frontière franco-espagnole. Cependant le modèle a montré qu'à certaines dates, qui correspondent au pic d'abondance des populations de culicoïdes en Corse, des évènements de vents plus rares peuvent transporter des particules depuis la Corse jusqu'en France continentale (Figure 13).

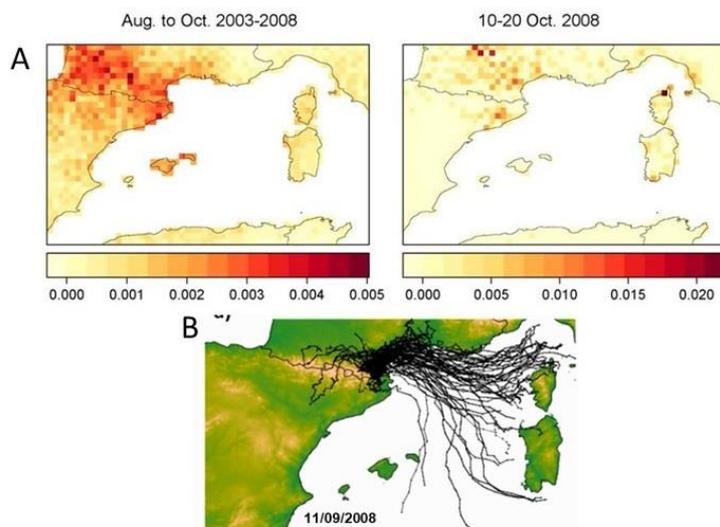


Figure 13 Introduction de *C. imicola* à partir de la Corse liée au transport par les vents : origine des vents transportant potentiellement *C. imicola* vers l'emplacement du piège dans les Pyrénées-Orientales à l'aide du modèle de dispersion NAME (A) et exemple de rétro trajectoire des particules sur 36 heure au pic d'abondance des populations de *Culicodes* en Corses (B)

Des analyses sont actuellement en cours afin de caractériser l'influence du paysage ainsi que des variables environnementales sur la dispersion de cette espèce dans la partie Ouest du Bassin méditerranéen. L'objectif est d'estimer la friction du paysage, les chemins de dispersion sur ce paysage ainsi que l'effet des facteurs environnementaux sur la distance génétique (Figure 14). Les premiers résultats montrent que la dispersion passive des culicoides est largement influencée par la vitesse et la direction du vent, la température et que la mer ne constitue pas une barrière à la dispersion même si elle peut en modifier la trajectoire. La dispersion active est principalement déterminée par la densité des hôtes, la température de l'air, les précipitations et la qualité de l'habitat.

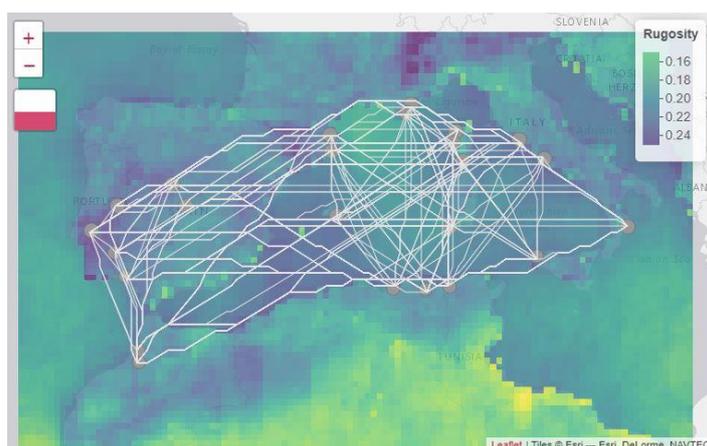


Figure14 Carte préliminaire de rugosité estimée et des chemins de dispersion à moindre coût pour *C. imicola* dans la partie Ouest du Bassin méditerranéen

La distribution de *C. imicola* est limitée au Sud de la France (dans le Var et les Pyrénées-Orientales) (Figure 15), ce qui questionne sur son potentiel à s'étendre au-delà de ces régions (Venail et al. 2012).

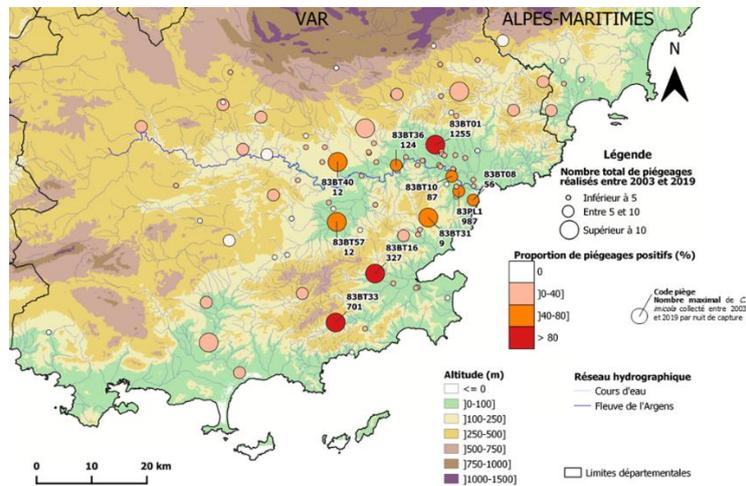


Figure 15 Carte de la distribution géographique et de l'abondance de *Culicoides imicola* dans le Var et les Alpes Maritimes d'après les données de surveillance obtenues entre 2003 et 2019.

Pour y répondre, nous nous sommes intéressés à la dynamique évolutive des populations à l'échelle locale en comparant deux zones de distribution : une centrale en Corse, et une marginale dans le département du Var. En combinant suivis entomologiques et génétique des populations, cette étude a révélé (i) une très faible abondance et diversité génétique des populations dans le Var (Figure 16 a, b), contrairement aux populations de Corse, et (ii) une différenciation génétique marquée entre les populations corses et varoises, qui semble croître dans le temps (Figure 16 c). Cela suggère que les populations marginales sont potentiellement plus sensibles aux fluctuations environnementales (par exemple les densités de bovins/ovins, les conditions climatiques) et aux facteurs démographiques telles que la dérive génétique ou les goulets d'étranglement. Ainsi, des conditions environnementale et climatiques non optimales, couplées à de faibles abondances des populations peuvent contribuer à limiter l'expansion de *C. imicola* en France.

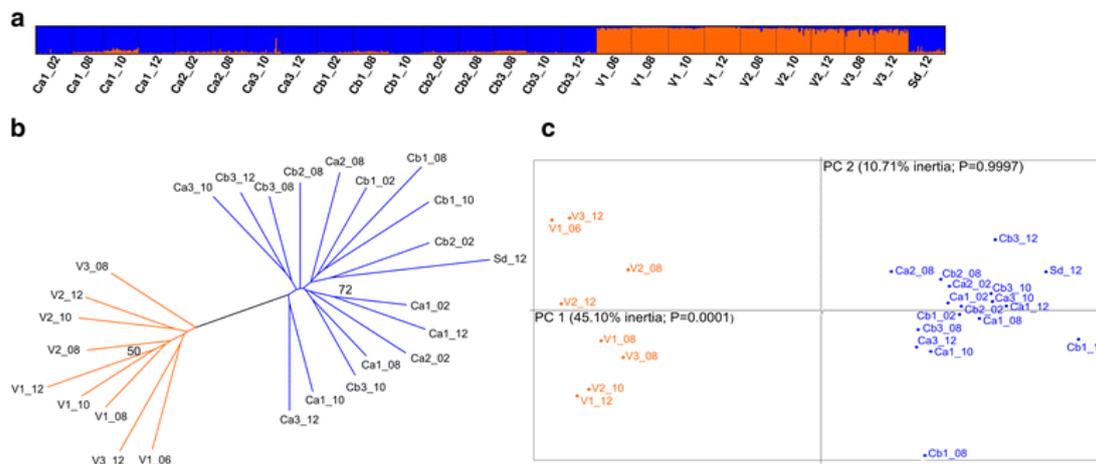


Figure 16 Structure génétique des populations de *Culicoides imicola* à partir des données microsatellites. a Clustering génétique des échantillons de *C. imicola*. Chaque ligne verticale représente un individu et chaque couleur représente un cluster. b Arbre en neighbor-joining basé sur la distance génétique de Cavalli-Sforza & Edwards (1967). Les valeurs de bootstrap sont calculées sur 1 000 répliques (seules les valeurs > 50 % sont indiquées). c Analyse en composante principale basée sur les fréquences alléliques

L'ensemble de ce travail a permis une caractérisation des populations sources et des routes de colonisation empruntées par les populations colonisatrices pour étendre l'aire de répartition de l'espèce. Alors que la présence de cette espèce dans le bassin méditerranéen était décrite comme récente et liée au réchauffement climatique contemporain, nous avons montré que les populations méditerranéennes de l'espèce étaient installées depuis des décennies voire des siècles avant leur découverte. L'histoire de la colonisation de *C. imicola* est une excellente illustration des facteurs démographiques et évolutifs impliqués dans les processus de colonisation et notamment du rôle fondamental de la dispersion naturelle dans les phénomènes d'invasion. Une étude récente de phylogéographie de *C. imicola* à l'aide du gène COI, a mis en évidence un déséquilibre de liaison entre *Cardinium*, bactérie endosymbiotique des *Culicoides* et les mitochondries (Pilgrim et al. 2021). Les résultats obtenus reflètent les flux de gènes des endosymbiontes dans le bassin méditerranéen mais ne permettent pas d'élucider les flux de gènes de leurs hôtes. Ceci pourrait constituer un facteur supplémentaire pour expliquer certaines discordances mito-nucléaires que nous avons pu observer dans notre étude et cela nous conforte dans notre choix d'une approche combinant différents types de marqueurs moléculaires. Des travaux de génétique des populations réalisés avec un autre set de marqueurs microsatellites sur un plus petit nombre de populations semblent confirmer l'existence de différentes voies de dispersion de *C. imicola* dans la région méditerranéenne (Onyango et al. 2015b). Ils confirment également l'existence d'un flux génique entre le Kenya et les îles du sud-ouest de l'océan Indien soulignant un potentiel risque d'introduction de nouveaux sérotypes de BTV par des *Culicoides* infectés transportés par le vent vers ces îles. Les études de modélisation la distribution de *C. imicola*, indiquent que cette espèce verra ses habitats favorables s'étendre vers des latitudes plus élevées à la faveur du réchauffement climatique au cours des prochaines années (Gao et al. 2021a). Dans ce contexte de changement global, les études de génétiques de populations en permettant de mieux comprendre le fonctionnement des populations de *C. imicola*, vont permettre de mieux évaluer le potentiel de cette espèce à s'installer dans de nouveaux territoires devenus favorables, ainsi que d'évaluer les risques d'introduction de virus dans des zones précédemment indemnes.

*Ces travaux ont été réalisés par Stéphanie Jacquet dans le cadre de sa thèse sur la colonisation du bassin méditerranéen par C. imicola dirigée par Jérémie Bouyer et Christine Chevillon, encadrée par C. Garros et moi-même. Johana Restrepo dans le cadre de son stage de master 1 a également contribué à ce travail. Ce travail a fait l'objet de trois publications : n°21-23. Ces recherches ont été financées dans le cadre du projet VMERGE.*

### 2.2.2. Diversité génétique et dispersion de *Culicoides obsoletus* (Diptera : Ceratopogonidae) en région paléarctique

La Méditerranée et l'Europe connaissent depuis 1998 des épizooties récurrentes fièvre catarrhale ovine et de virus (FCO) de Schmallenberg (SB), virus transmis par des espèces de moucheron hématophages autochtones appartenant au genre *Culicoides* (Diptera : Ceratopogonidae), et touchant les ruminants domestiques d'élevage (bovins, ovins, caprins).

Fin 2011, le virus de Schmallenberg, autre virus des ruminants domestiques transmis par les *Culicoides*, a émergé en Europe de l'Ouest provoquant chez les ruminants des malformations congénitales et de la mortalité. La transmission très rapide de ce virus par les espèces autochtones de *Culicoides* a permis sa propagation à 14 pays européens en une seule année. Les analyses épidémiologiques récentes de ces épizooties montrent : (i) l'importance du vent dans la dispersion à longue et à courte distance des *Culicoides* (Sedda et al. 2012, Burgin et al. 2013, Sedda and Rogers 2013, Sedda et al. 2015), (ii) que la circulation du virus de la FCO en France s'est effectuée de proche en proche (Pioz et al. 2011), (iii) et que l'arrêt des mouvements d'animaux d'élevage n'aurait pas affecté la transmission du virus de Schmallenberg (Gubbins et al. 2014). Les études de capture-marquage-recapture ont montré la grande difficulté de mise en œuvre de ces expérimentations chez les

*Culicoides* pour évaluer les capacités de dispersion des espèces vectrices (Kirkeby et al. 2013, Kluiters et al. 2015). Ainsi, l'apport de nouveaux éléments de compréhension sur la structuration et les capacités de dispersion des espèces d'intérêt de *Culicoides* sont primordiaux et devraient permettre une meilleure gestion du risque épidémiologique.

La dispersion des *Culicoides* correspond à ce que les écologues qualifient de dispersion stratifiée ou « stratified dispersal » qui résulte de la combinaison de processus survenant à différentes échelles spatiales, c'est-à-dire de diffusion à faible distance combinée à des sauts sur de plus longues distances. Si les vents régionaux et les mouvements d'air locaux ont un rôle indéniable dans la dispersion des *Culicoides*, des facteurs anthropiques jouent également un rôle prépondérant, notamment à l'échelle locale (répartition des hôtes, structuration du paysage). L'influence de ces différents facteurs va également être modulée en fonction des espèces de *Culicoides* considérées, celles-ci présentant des préférences d'hôte et d'écologie larvaire différentes. Il est donc crucial de comprendre l'importance relative des différents modes de dispersion des *Culicoides* ainsi que le rôle des facteurs biotiques et abiotiques influençant cette dispersion.

L'objectif de ce travail sera de déterminer par l'observation de patrons de distributions des fréquences alléliques, comment la dispersion a pu façonner l'arrangement spatial de la diversité génétique et notamment comment celle-ci est influencée par les paysages et par les caractéristiques des habitats qui peuvent selon le cas favoriser ou limiter les mouvements des *Culicoides*. Une espèce paléarctique vectrice de FCO et du virus Schmollenberg, *Culicoides obsoletus* a été choisie comme modèle d'étude. *C. obsoletus* est une espèce très largement répandue, capable de se reproduire dans une large gamme d'habitats. Cependant, *C. obsoletus* est une espèce sympatrique avec une espèce morphologiquement non distinguable, *C. scoticus*. De plus, plusieurs auteurs ont récemment signalé l'existence d'une diversité cryptique au sein de l'espèce (Ander et al. 2013, Elbers et al. 2013, Meiswinkel et al. 2015). Ceci nous a obligé à nous assurer du statut taxonomique des individus inclus dans notre étude. Cette étude a été menée à différentes échelles afin d'avoir une vision complète des phénomènes sous-jacents.

#### *Diversité cryptique au sein du complexe Obsoletus/Scoticus à l'échelle européenne*

La littérature définit le groupe *Obsoletus* comme un groupe d'espèces difficilement distinguables morphologiquement, notamment pour les femelles qui ne sont pas différenciables sur la base de critères morphologiques, hormis par les experts (Meiswinkel et al. 2004, Mathieu 2011, Hadj-Henni et al. 2015). Les adultes des espèces de ce groupe sont connus pour être abondants, répandus à travers l'Europe centrale et septentrionale. A l'heure actuelle, le groupe est une entité taxonomique artificielle encore mal définie, sans véritable consensus sur les espèces incluses. Actuellement, le Groupe *Obsoletus* est composé de neuf espèces valides : *C. obsoletus* (Meigen), 1818 ; *C. sinoensis* Tokunaga, 1937 ; *C. scoticus* Downes & Kettle, 1952 ; *C. montanus* Shakirzjanova, 1962 ; *C. gornostaevae* Mirzaeva, 1984 ; *C. abchazicus* Dzhafarov, 1964 ; *C. filicinus* Gornostaeva & Gachegova, 1972 ; *C. alachua* Jamnback & Wirth, 1963 ; et *C. sanguisuga* (Coquillett, 1901).

En plus de ce groupe, Meiswinkel et collaborateurs (Meiswinkel et al. 2015) ont défini le complexe *Obsoletus* qui regroupe des taxons pour lesquels la morphologie des femelles est très similaire. Ce complexe comprend *C. obsoletus*, *C. montanus* et *C. scoticus*. Plusieurs auteurs ont récemment signalé l'existence d'une diversité cryptique au sein de *C. obsoletus*, à savoir *C. obsoletus* clade "O2" et *C. obsoletus* clade "O3" en Suède et en Suisse (Ander et al. 2013), et *C. obsoletus* clade "dark" aux Pays-Bas (Elbers et al. 2013, Meiswinkel et al. 2015). Nous allons utiliser ici le terme "complexe *Obsoletus/Scoticus*" pour désigner les espèces cryptiques *C. obsoletus*, *C. scoticus* et *C. montanus* ainsi que l'ensemble de ces clades nouvellement décrits dans la littérature.

Le complexe *Obsoletus/Scoticus*, tel qu'il se présente actuellement dans la littérature, est confus et nécessite une révision. De plus les espèces cryptiques sympatriques peuvent présenter des compétences vectorielles différentes et peuvent ainsi biaiser les enquêtes épidémiologiques. Il apparaît donc nécessaire d'évaluer la diversité intra- et interspécifique au sein de ce complexe.

Nous avons donc caractérisé et cartographié la diversité au sein complexe *Obsoletus/Scoticus* sur une zone allant des de la Scandinavie aux îles Canaries (du nord au sud) et des îles Canaries à la Turquie (d'ouest en est). Nos principaux objectifs étaient d'identifier et décrire la diversité cryptique observée au sein du complexe *Obsoletus/Scoticus* sur une vaste zone géographique en utilisant des analyses moléculaires et de questionner le statut taxonomique de certains clades nouvellement décrits. Nous avons donc mené une étude moléculaire qui combinait le séquençage de plusieurs marqueurs (COI, ADN ribosomique 16S et 28S), des analyses phylogénétiques ainsi que des analyses de délimitation d'espèces afin d'explorer la diversité génétique au sein du complexe *Obsoletus/Scoticus* en l'Europe occidentale.

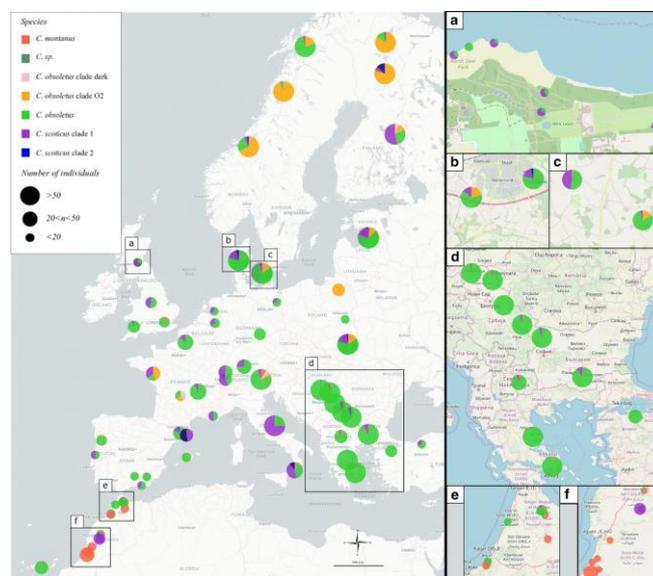


Figure 17 Sites d'échantillonnage des moucheron piqueurs représentés par le nombre d'individus par clade au sein du Complexe *Obsoletus/Scoticus*

De fortes variations de latitudinales dans la diversité des espèces cryptique a été observée (Figure 17). Cette étude clarifie les relations phylogénétiques entre les espèces appartenant au complexe *Obsoletus/Scoticus*. Nous avons identifié et a validé cinq unités moléculaires taxonomiques opérationnelles (MOTU), *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. obsoletus* clade O2, *C. obsoletus* clade dark et une MOTU correspondant à une espèce non identifiée (Figure 18). Ces trois dernières espèces n'ont pas été formellement décrites mais nos résultats confirment qu'elles doivent être considérées comme des espèces à part entière. Des études plus détaillées de leur morphologie et l'écologie seront nécessaires pour fournir une description plus détaillée de ces espèces. En outre, nos résultats soulèvent des questions concernant le statut taxonomique de *C. montanus*, qui était auparavant considérée comme une espèce taxonomiquement valide.

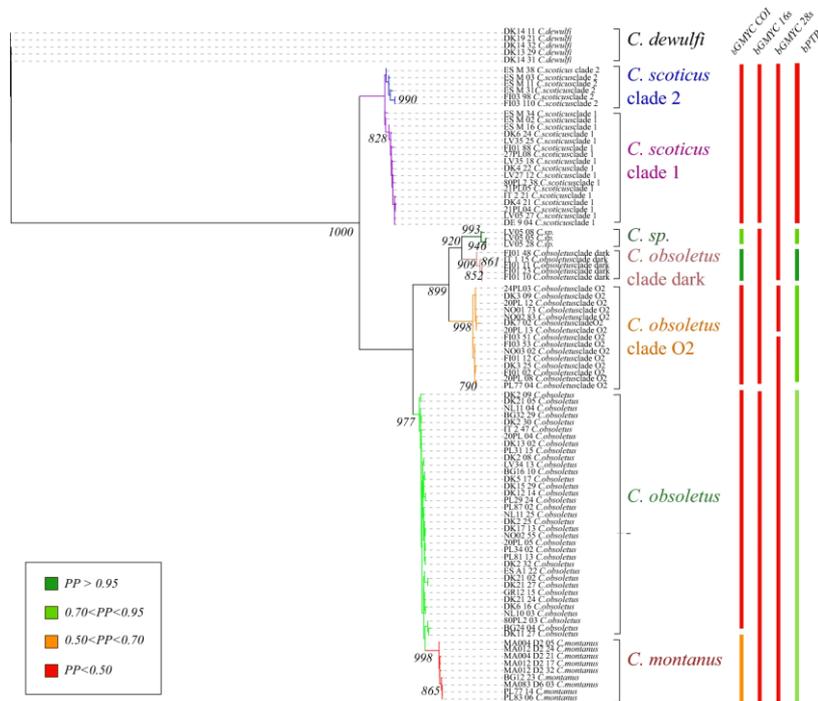


Figure 18 Arbre phylogénétique en maximum de vraisemblance des gènes concaténés (cox1 ; 16S rDNA) représentant la délimitation des espèces et les relations au sein du complexe Obsolete/Scoticus

Une forte connectivité des populations de *C. obsoletus* à l'échelle européenne

*Culicoides obsoletus* est une espèce autochtone et abondante en Europe. Elle est très largement distribuée dans une zone allant de l'Afrique du Nord (Sghaier et al. 2017, Bourquia et al. 2019, Hakima et al. 2020), aux Canaries (Martinez-de la Puente et al. 2012) jusqu'au Nord de l'Europe (Mignotte et al. 2020). Cependant, bien que son aire de distribution soit centrée sur l'Europe, elle est également présente sur deux autres zones de l'hémisphère nord (Borkent 2016), en Amérique (Anderson et al. 1991, Borkent 2016), et en Asie (Cha and Sik 1974, Gao et al. 2021b). Cette espèce est donc considérée comme étant paléarctique et néarctique (Mathieu 2011, Borkent 2016). Cependant l'abondance de *C. obsoletus* varie fortement selon les pays (Cuéllar et al. 2018). Nos travaux réalisés au sein du complexe Obsolete/Scoticus ont ainsi montré une proportion décroissante de *C. obsoletus* capturés suivant un gradient européen Est-Ouest (Mignotte et al. 2020). En effet, dans la péninsule des Balkans, *C. obsoletus* est l'espèce la plus abondante du complexe, presque la seule espèce capturée lors des enquêtes d'échantillonnage. Au contraire, on la trouve en plus faible proportion en Europe du Nord (Mignotte et al. 2020) et beaucoup plus rarement en Afrique du Nord (Sghaier et al. 2017, Bourquia et al. 2020, Hakima et al. 2020).

Durant les épisodes glaciaires du Pléistocène, l'aire de répartition géographique, la structure génétique et l'histoire démographique de la plupart des espèces européennes ont été impactées. En Europe, les péninsules balkanique, italienne et ibérique ont joué le rôle de refuges glaciaires en raison de la réduction des zones viables pendant les épisodes glaciaires (Petit et al. 1998, Taberlet et al. 1998, Hewitt 2004). Pendant les périodes interglaciaires, ces péninsules ont été l'origine géographique de l'expansion spatiale et démographique de nombreuses espèces (Rodríguez-Sánchez et al. 2010, Abellán and Svenning 2014). D'importants flux de gènes ont été démontrés entre des zones géographiques éloignées chez les espèces de *Culicoides* du bassin méditerranéen (Jacquet et al. 2016a), en Afrique (Onyango et al. 2015a) et en Australie (Pili et al. 2010). La capacité de dispersion est une composante importante pendant les périodes de recolonisation d'habitats nouvellement

disponibles, comme c'est le cas pendant les périodes interglaciaires. Cela permet une expansion spatiale et démographique rapide vers des niches écologiques redevenues vacantes.

L'objectif de ce travail a été de déterminer comment la dispersion et les événements historiques ont pu façonner l'arrangement spatial de la diversité génétique. Cette étude a été menée à l'échelle continentale, sur deux transects allant du Maroc à la Finlande et de la Turquie au Royaume-Uni. Nous avons utilisé 11 marqueurs microsatellites et un gène mitochondrial (COI), pour identifier la structure génétique et phylogéographique de *C. obsoletus* à l'échelle européenne et déterminer les événements historiques qui ont façonné la structuration génétique actuelle.

Notre étude a mis en évidence de faibles niveaux de différenciation génétique entre les populations à l'échelle européenne, avec d'importants flux de gènes au niveau continental et une forte connectivité entre des populations séparées par de grandes distances géographiques. Nous avons observé un niveau significatif mais faible d'isolement par la distance en Europe continentale qui suggère un modèle de migration en pas japonais. Celle-ci est compatible avec la combinaison des capacités de dispersion passive et active des espèces de *Culicoides* comme cela a déjà été démontré pour *C. imicola* (Jacquet et al. 2016b). La dispersion passive des *Culicoides* par les vents sur de longues distances contribue certainement à brouiller le signal d'isolement par la distance. Seule la population des îles Canaries est bien différenciée génétiquement ce qui peut s'expliquer par son caractère insulaire. Elle est en effet, susceptible d'avoir connu des goulots d'étranglement lors de la colonisation initiale de l'île.

Les analyses de mismatch basées sur le gène COI, la forme du réseau d'haplotypes en étoile centré sur quelques haplotypes majoritaires (Figure 19), combinés à des valeurs négatives significatives du D de Tajima (Tajima 1989) et du  $F_s$  de Fu (Fu 1997), suggèrent une expansion démographique rapide de *C. obsoletus* en Europe. Cette expansion démographique récente est cohérente avec l'histoire démographique de la plupart des espèces européennes, marquée par les épisodes glaciaires du Pléistocène (Hewitt 2004, Phillips et al. 2010). Étant donné la dépendance des *Culicoides* vis-à-vis des hôtes bovins, le développement de l'agriculture moderne peut également avoir contribué à l'explosion démographique de *C. obsoletus* en Europe.

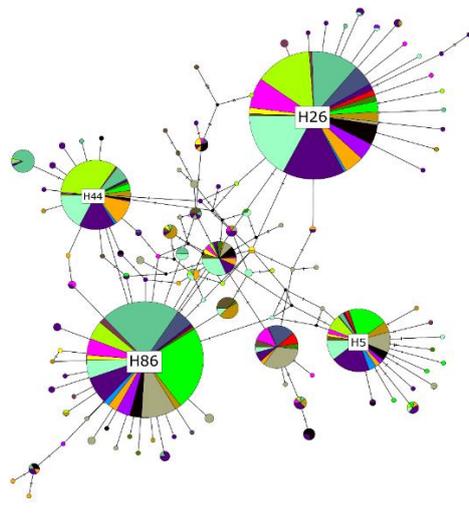


Figure 19 Réseau d'haplotype des séquences mitochondriales COI de *C. obsoletus*. La taille des cercles est proportionnelle au nombre d'individus. Les couleurs représentent le pays dans lesquels les individus ont été échantillonnés. La longueur des branches séparant les haplotypes est proportionnelle au nombre d'étapes mutationnelles entre eux.

La faible diversité des espèces au sein du complexe *Obsoletus/Scoticus* observée dans le sud-est de l'Europe et les Balkans (Mignotte et al. 2020), combinée à la grande richesse allélique observée pour *C. obsoletus* dans cette région, nous a conduit à émettre l'hypothèse que cette zone aurait pu servir de refuge à cette espèce au cours du Pléistocène. Plusieurs scénarios ont été testés par la méthode ABC (Figure 20). Le scénario le plus probable un scénario identifiant les Balkans et la région arctique comme l'origine post-glaciaire des populations ancestrales, il y a 5 000 à 10 000 ans, qui après des événements d'admixture plus récents (il y a 2 500 ans) auraient donné naissance aux populations d'Europe occidentale (Scénario 1, Figure 19). Le logiciel DIYABC (Cornuet et al. 2014) utilisé pour réaliser ces analyses ne permettant pas d'inclure les phénomènes de migration récurrents dans les scénarios testés, des analyses sont actuellement en cours avec le logiciel ABCtoolbox (Wegmann et al. 2010) qui prend en compte la migration, afin de pouvoir affiner ces scénarios.

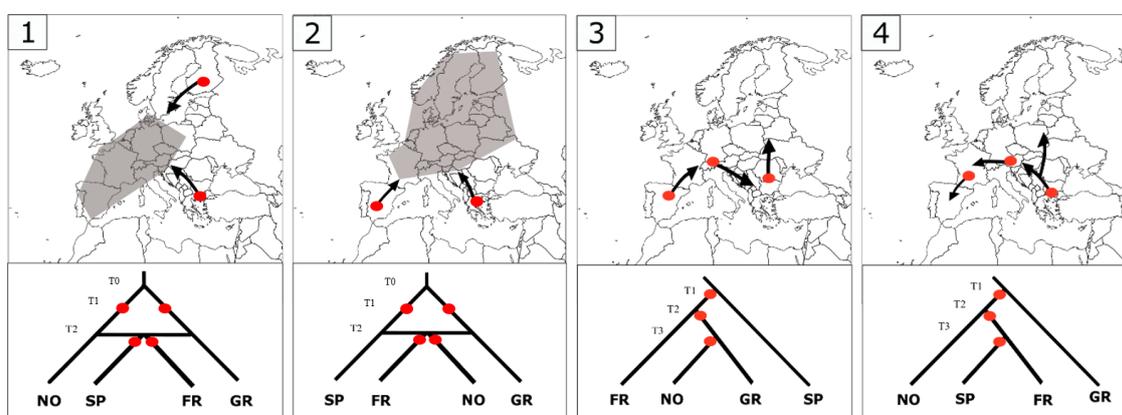


Figure 20 Représentation graphique des quatre scénarios simulés à l'aide d'une approche approximative bayésienne computation (ABC) sur des données microsatellites. Les cercles rouges correspondent à un événement de goulot d'étranglement. T1, T2 et T3 correspondent aux temps de divergence. NO : population de Norvège, SP : population d'Espagne, FR : population de France, GR : population de Grèce.

L'utilisation de marqueurs mitochondriaux et microsatellites nous a donc permis de mettre en évidence un manque de structure phylogéographique et génétique, une augmentation récente de la taille effective des populations liée à une recolonisation post-glaciaire à partir de refuges nordiques et balkaniques, puis une expansion géographique vers l'Ouest de l'Europe des populations issues des refuges. L'expansion récente des populations met en évidence le rôle potentiel de l'épisode glaciaire et de d'événements de colonisation post-glaciaire dans le façonnement de la distribution géographique de *C. obsoletus*.

Si notre étude permet de proposer une histoire pour la région ouest paléarctique, l'histoire globale n'est pas encore complète. En effet, bien que son centre de distribution semble être en Europe, *C. obsoletus* est présent dans de nombreux pays de l'hémisphère nord (Anderson et al. 1991, Mathieu 2011, Sprygin et al. 2014, Borkent 2016, Gao et al. 2021b). La présence de l'espèce en Amérique et en Asie questionne quant au scénario évolutif ayant permis cette large répartition géographique. Nous émettons l'hypothèse, en raison de l'histoire évolutive récente européenne, que ce passage du continent asiatique au continent américain aurait pu se faire durant les derniers épisodes de glaciations du Pléistocène par le détroit de Béring (Figure 21). *Culicoides obsoletus* est retrouvé des deux côtés de l'Océan Pacifique, côté oriental dans la région de Magadan à l'extrême est de la Russie (Sprygin et al. 2014) et du côté occidental en Colombie Britannique sur la côte ouest du Canada (Anderson et al. 1991). Durant les épisodes successifs de glaciation du Pléistocène, le détroit de Béring, en raison de l'abaissement du niveau de la mer, permettait la connexion des deux principaux refuges

de glaciation arctique, la Béringie occidentale (Yukon, Canada) et la Béringie orientale (Sibérie) (DeChaine 2008, Bowden and Buddle 2010, Klimaszewski et al. 2015). De plus, l'écosystème qui était retrouvé en Béringie est semblable à celui dans lequel *C. obsoletus* peut évoluer. Il est raisonnable d'imaginer que *C. obsoletus*, grâce à son comportement trophique généraliste et à sa forte plasticité écologique, ait pu persister dans ce refuge et même passer de la Béringie orientale à la Béringie occidentale, grâce à ses fortes capacités de dispersion passive.

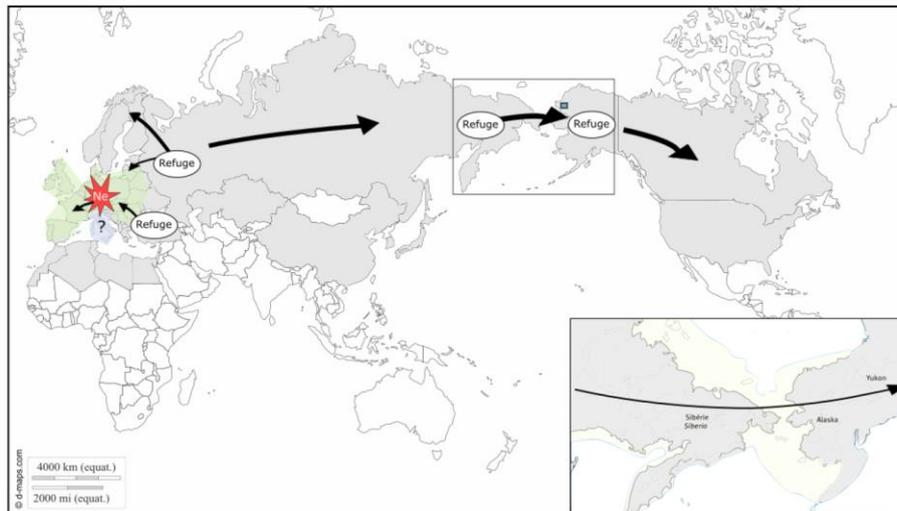


Figure 21 Hypothèse de scénario d'expansion mondiale de *C. obsoletus*. Les zones grises indiquent des pays dans lesquels *C. obsoletus* est présente. Les zones vertes représentent des zones d'admixture des populations. La zone bleue correspond à une zone en Europe qui n'a pas pu être incluse dans nos analyses mais qui devra être considérée dans le futur. Les cercles blancs indiquent l'emplacement de refuges glaciaires. Ne désigne une expansion démographique. Le beige désigne l'abaissement du niveau de la mer durant la glaciation.

#### *D'importantes capacités de dispersion de Culicoides obsoletus*

Lors d'une épidémie de maladie à transmission vectorielle, une compréhension précise de la capacité de dispersion des espèces vectrices est un facteur clé pour mettre en œuvre des stratégies de contrôle appropriées afin de limiter la propagation de la maladie. La dispersion des culicoïdes peut être qualifiée de « stratifiée » et est influencée par la composition et la configuration du paysage qui va selon ses caractéristiques, favoriser (conductance) ou freiner (résistance) la dispersion de ces diptères.

Nous avons donc entrepris d'identifier les facteurs environnementaux qui favorisent ou limitent les flux géniques de *Culicoides obsoletus*, à l'échelle française, en utilisant un cadre méthodologique innovant intégrant des approches spatiales, statistiques et de génétique des populations (Figure 22). Afin d'identifier les facteurs environnementaux ayant un impact sur la dispersion des culicoïdes, nous avons utilisé une approche individuelle qui permet de prendre en compte le fait que les populations de *Culicoides* ne sont certainement pas structurées spatialement en populations distinctes et doivent plutôt être considérées comme un continuum d'individus, répartis de manière hétérogène dans le paysage. Cette approche individuelle en génétique des paysages permet de maximiser le nombre de sites d'échantillonnage et apporte ainsi un bien plus grand pouvoir de détection des schémas spatiaux de différenciation génétique et des facteurs environnementaux qui en sont la cause (Landguth et al. 2010).

### Etapes méthodologiques

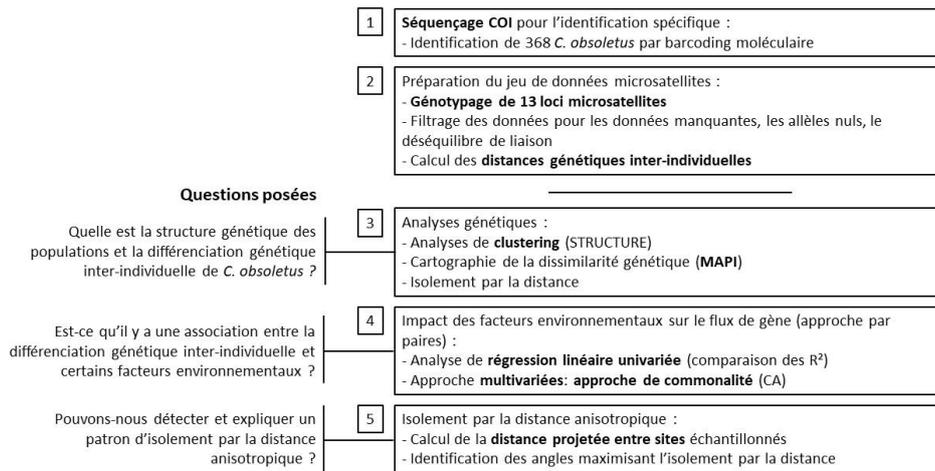


Figure 22 Analyses de génétique des populations et du paysage effectuées dans le cadre de l'étude des facteurs environnementaux qui influent sur les flux géniques de *C. obsoletus* à l'échelle française.

L'étude a été menée en France sur 348 individus collectés sur 46 sites et génotypés à l'aide d'un jeu de 11 marqueurs microsatellites, développés à cette occasion pour *C. obsoletus* (Mignotte et al. 2021).

Nous avons observé une faible différenciation génétique et une faible structuration des populations de *C. obsoletus* à cette échelle. En utilisant trois distances génétiques inter-individuelles complémentaires, nous n'avons pas détecté d'isolement par la distance significatif. Ceci reflète un haut niveau de flux génique comme cela a déjà pu être observé pour d'autres espèces de *Culicoides* comme *C. imicola* en France (Jacquet et al. 2016a), *C. brevitarsis* en Australie (Onyango et al. 2015b) ou *C. stellifer* en Amérique du Nord (Shults et al. 2020).

Nous avons ensuite étudié l'impact potentiel de plusieurs facteurs environnementaux sur la différenciation génétique de *C. obsoletus*. En pratique, nous avons testé l'association entre des matrices de distances génétiques et des matrices de distances environnementales. Alors que la contribution unique de tous les facteurs environnementaux testés était très faible, celle de la densité du bétail est la plus forte que nous avons détectée. Les déplacements actifs des *Culicoides* liés à la recherche d'hôtes pourraient ainsi avoir contribué à homogénéiser la diversité génétique. Ces résultats sont concordants à ceux obtenus dans les études de génétique du paysage du virus de la fièvre catarrhale ovine, qui avaient identifié la répartition des bovins et des ovins comme un facteur clé dans la dispersion de ce virus (Jacquot et al. 2017).

Les individus les plus dissemblables génétiquement sont principalement situés dans les populations les plus méridionales de la zone d'échantillonnage. Une dispersion des *Culicoides* favorisée par les vents pourrait expliquer l'important isolement anisotropique par distance (Jay et al. 2012), c'est-à-dire dépendant de la direction, observé sur l'axe Nord/Sud en France (Figure 23).

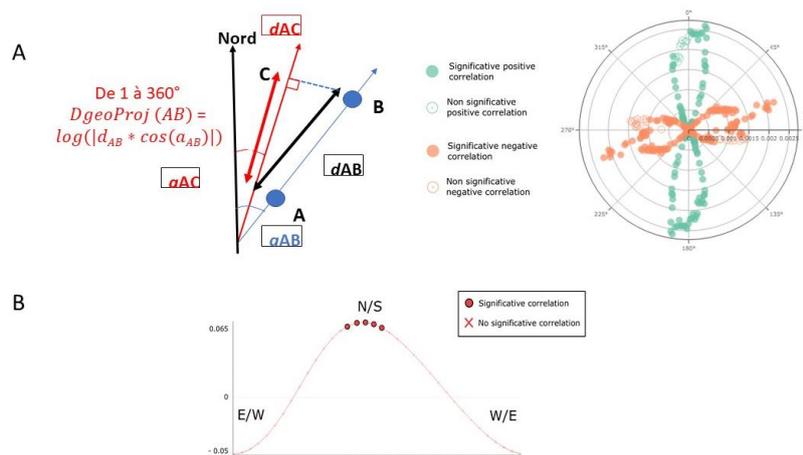


Figure 23 (A) Isolement anisotropique par la distance, corrélation entre les distances géographiques projetées par angle et les distances génétiques interindividuelles (aR, (Rousset 2000)). La matrice des distances projetées a été calculée pour chaque angle entre tous les sites d'échantillonnage, à l'aide de la formule présentée. Une régression linéaire des distances génétiques sur les distances géographiques projetées obtenues pour chaque angle a ensuite été effectuée. L'angle qui maximise le R2 de cette régression avec un coefficient de régression positif a été considéré comme l'angle maximisant l'isolement par la distance. (B) Bearing analysis, corrélation entre la distances génétiques (aR) et géographiques en fonction de l'angle entre les sites d'échantillonnage.

Les phénomènes de dispersion causés par le vent ont déjà été établis pour les *Culicoides*, principalement au-dessus des mers (Murray and Kirkland 1995, Alba et al. 2004, Gloster et al. 2008, Jacquet et al. 2016b). Les événements de dispersion des *Culicoides* à l'échelle locale résultent d'une combinaison de déplacement passifs et actifs. En effet, lors des recaptures celles-ci ont lieu à la fois sous le vent et au vent de la direction du vent dominant (Kluiters et al. 2015). Sur la carte de la direction moyenne du vent en France au cours des 10 dernières années (Figure 24), on peut voir que les sites d'échantillonnage situés les plus au sud et qui présentent les individus génétiquement les plus dissemblables se trouvent dans une zone où la direction du vent est différente du reste de la France. Lors d'étude précédentes, la diffusion du virus de la FCO, et donc la dispersion des *Culicoides*, a déjà été associée à la direction du vent (Sedda et al. 2012, Sedda et al. 2015).

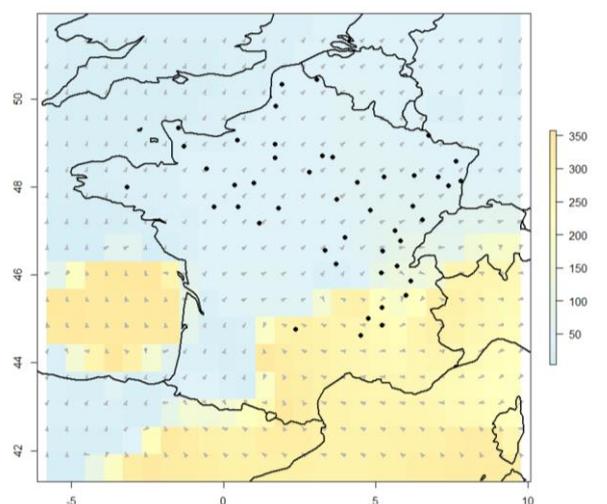


Figure 24 Carte de la direction moyenne des vents en France entre 2000 et 2010

Nos résultats sont en cohérence avec une très forte capacité de dispersion de *C. obsoletus* au-dessus des terres. Une telle capacité de dispersion de cette espèce vectrice nécessite une réévaluation de l'impact des *Culicoides* sur la dispersion du virus, qui a certainement été largement sous-estimée. Cette étude fournit des informations importantes sur la capacité de dispersion des culicoïdes ainsi que des facteurs sous-jacents, qui pourraient alimenter les modèles de prévision de la propagation des virus. Cela met en évidence le besoin urgent de mieux intégrer les informations moléculaires, spatiales et statistiques pour orienter la surveillance et le contrôle des maladies à transmission vectorielle.

L'ensemble de ce travail sur *C. obsoletus* a permis de clarifier le schéma taxonomique du Complexe *Obsoletus/Scoticus* en région paléarctique, et de mettre en évidence une forte dispersion de *C. obsoletus* au-dessus des terres, et de décrire l'histoire évolutive et démographique de *C. obsoletus* en Europe. L'ensemble de ces résultats met en lumière l'importance du paysage dans la connectivité paysagère des populations, et amène à repenser l'importance de la circulation du virus par le biais des insectes vecteurs. Le travail réalisé sur la diversité cryptique au sein du Complexe *Obsoletus/Scoticus* pourrait être à l'avenir étendu au niveau d'autres complexes présentant un intérêt en région paléarctique pour la transmission des mêmes virus comme les complexes *Newsteadi* et *Pulicaris* au sein du sous-genre *Culicoides*. Des études moléculaires, menées en Catalogne ont révélé de nouvelles espèces cryptiques précédemment non décrites qui ont été regroupées dans ces complexes d'espèces (Pagès et al. 2009, Talavera et al. 2017). Il pourrait être intéressant à l'avenir, de pouvoir déployer une méthodologie similaire de description de la diversité, de taxonomie moléculaire et de délimitation d'espèces sur ces complexes.

*Ces travaux ont été réalisés par Antoine Mignotte dans le cadre de sa thèse, dirigée par Claire Garros et que j'ai encadrée. Léa Poujol et Maïa de Wavrechin, stagiaires en BTS ont également contribué à ce travail. Ce travail a fait l'objet de deux publications : n°32 et 33. Une dernière publication est en cours de rédaction Ces recherches ont été financées dans le cadre du projet PALE-Blu.*

### 2.2.3. Autres travaux en taxonomie moléculaire sur le genre *Culicoides*

Les relations phylogénétiques entre les espèces de *Culicoides* de la région afrotropicale sont problématiques car le placement des espèces dans des sous-genres ou groupes spécifiques ne fait pas consensus (Harrup et al. 2015). En effet, la classification au sein des genres est basée sur la similarité morphologique entre les espèces notamment sur les patrons alaires ou la morphologie des génitalia mâles, ce qui ne reflète en rien les relations phylogénétiques réelles (Borkent 2016). Plusieurs marqueurs moléculaires ont été évalués positivement pour déduire les relations phylogénétiques ou la délimitation moléculaire entre espèces de *Culicoides* (Harrup et al. 2015). Ces marqueurs sont maintenant largement utilisés pour l'identification des espèces, en particulier pour celles qui sont difficiles à séparer morphologiquement (voir par ex. (Nolan et al. 2007, Pagès et al. 2009, Monaco et al. 2010)), mais ils ont été plus rarement utilisés pour évaluer les relations phylogénétiques chez les *Culicoides* (par ex. (Bellis et al. 2014)).

Dans cette étude, deux fragments de gènes mitochondriaux (COI et ADNr 16S) et deux fragments de gènes nucléaires (CAD et ADNr 28S) ont été séquencés afin de reconstruire les relations phylogénétiques, par inférence bayésienne et maximum de vraisemblance, au sein des sous-genres *Avaritia*, *Remmia* and *Synhelea* et des groupes *Milnei*, *Neavei* and *Similis*. Des analyses bGMYC (Bayesian General Mixed Yule Coalescent model) and the PTP (Bayesian Poisson Tree Processes) ont été effectuées afin d'explorer les délimitations de ces espèces. Toutes les relations entre les espèces au sein des sous-genres et des groupes étudiés sont bien étayées par l'utilisation de caractères morphologiques combinée aux analyses moléculaires. Ce travail a ainsi permis de réviser la classification systématique interne actuelle des *Culicoides* et d'identifier une nouvelle espèce potentielle au sein du groupe *Imicola*, au sein du sous-genre *Avaritia* dans la région afrotropicale (Figure 25). Il a ensuite été possible d'établir et de valider une base de données barcode de référence pour les espèces afrotropicales de *Culicoides*. Cet outil va permettre une identification rapide et fiable

des espèces vectrices sur le terrain et notamment des stades immatures ce qui va faciliter l'étude de leur biologie et de leur écologie.

| Sous-genre                        | Groupe                      | Espèces                                       |   |
|-----------------------------------|-----------------------------|---|---|
| Avaritia Fox<br>Monophylétique    | Dasyops<br>Monophylétique   | <i>C. kanagai</i> Khamala and Kettle          | ← Nouvelle espèce au sein du groupe Dasyops                                     |
|                                   |                             | <i>C. sp. #54</i> dark form Meiswinkel        |   |
|                                   | Imicola<br>Monophylétique   | <i>C. boltinos</i> Meiswinkel                 | ] Toutes les espèce du groupe Imicola sont incluses dans le sous-genre Avaritia |
|                                   |                             | <i>C. imicola</i> Kieffer                     |   |
|                                   |                             | <i>C. kwagga</i>                              |   |
|                                   |                             | <i>C. loxodontis</i> Meiswinkel               |   |
|                                   |                             | <i>C. miombo</i> Meiswinkel                   |   |
|                                   |                             | <i>C. pseudopallidipennis</i> Clastrier       |   |
|                                   |                             | <i>C. sp. #22</i>                             |   |
|                                   | Orientalis                  | <i>C. trifasciellus</i> Goetghebuer           | ← Espèce appartenant au groupe Orientalis                                       |
|                                   |                             | <i>C. sp. #20</i>                             |   |
|                                   | Grahamii                    | <i>C. grahamii</i> Goetghebuer                | ] Espèces placées dans le sous-genre Avaritia                                   |
|                                   |                             | <i>C. gulbenkiani</i> Caeiro                  |   |
| -                                 | -                           | <i>C. kibatiensis</i> Goetghebuer             | ]   |
|                                   |                             | <i>C. austeni</i> Carter                      |   |
| -                                 | Milnei<br>Monophylétique    | <i>C. isioleensis</i> Cornet, Nevillet Walker | ]   |
|                                   |                             | <i>C. milnei</i> Austen                       |   |
|                                   |                             | <i>C. moreli</i> Clastrier                    |   |
|                                   |                             | <i>C. zuluensis</i> de Meillon                |   |
|                                   |                             | <i>C. expectator</i> Clastrier                |   |
| Synhelea Kieffer                  | Tropicalis                  | <i>C. tropicalis</i> Kieffer                  | ] Groupes Similis et Neavei placés dans le sous-genre Synhelea                  |
|                                   | Neavei                      | <i>C. neavei</i> Austen                       |   |
|                                   |                             | <i>C. ovalis</i> Khamala et Kettle            |   |
|                                   | Similis                     | <i>C. ravus</i> de Meillon                    |   |
| Remmia Glukhova<br>Monophylétique | Schultzei<br>Monophylétique | <i>C. enderleini</i> Cornet et Brunhes        | ← <i>C. oxystoma</i> potentiel complexe d'espèces cryptiques                    |
|                                   |                             | <i>C. kingi</i> Austen                        |   |
|                                   |                             | <i>C. nevilli</i> Cornet et Brunhes           |   |
|                                   |                             | <i>C. oxystoma</i> Kieffer                    |   |
|                                   |                             | <i>C. subschultzei</i> Cornet et Brunhes      |   |

Figure 25 Révision taxonomique et systématique des sous-genres *Avaritia* Fox, *Remmia* Glukhova, et des groupes Milnei et Similis

Au Maghreb, le travail a consisté en la mise à jour de la liste des espèces de *Culicoides* présentes au Maroc par une approche taxonomique intégrative utilisant l'identification morphologique complétée par de l'identification moléculaire. Après une revue des données disponibles sur les espèces de *Culicoides* au Maroc de 1968 à 2015 (publiées et littérature grise en français et en anglais), des collectes de *Culicoides* ont été réalisées autour de Rabat, la capitale du Maroc. Chaque individu collecté a été examiné et identifié morphologiquement au niveau de l'espèce, lorsque cela était possible. En parallèle, une identification moléculaire a été effectuée pour séparer les espèces étroitement apparentées, confirmer les identifications morphologiques difficiles ainsi que pour les espèces qui n'avaient jamais été décrites au Maroc. Au cours de cette étude 17 espèces ont ainsi été identifiées dont deux nouveaux signalements d'espèces pour le Maroc *C. paolae* et *C. subfagineus*. La faune marocaine des *Culicoides* comprend donc maintenant 54 espèces valides. Des travaux supplémentaires augmenteraient certainement ce total, car l'un des clades que nous avons identifiés n'était affilié à aucune espèce décrite et valide.

*Ces travaux ont été réalisés par deux étudiants en thèse encadrés par Claire Garros et Thomas Balenghien auxquels j'ai apporté mon expertise sur la phylogénie, la délimitation d'espèces et la taxonomie moléculaire. Ces travaux ont fait l'objet de trois publications : n° 27-29*

## 2.3. Travaux sur les tiques et maladies à tiques

### 2.3.1. Faibles tailles efficaces d'*A. variegatum* en Afrique de l'Ouest : implications sur les méthodes de contrôle basées sur l'utilisation d'acaricides

La taille efficace ( $N_e$ ) des populations de tiques a rarement été estimée malgré l'importance de ce paramètre pour évaluer le potentiel d'évolution et d'adaptation des populations de tiques (Araya-Anchetta et al. 2015). En effet, l'acquisition de nouveaux allèles (via la migration ou la mutation) est proportionnelle à  $N_e$ , le polymorphisme perdu par une population à chaque génération via la dérive génétique est proportionnel à  $1/N_e$  et donc seule une pression de sélection  $s$  vérifiant  $s \gg 1/N_e$  permet de surmonter l'effet de la dérive génétique de manière à avoir un impact réel sur la fréquence des allèles sélectionnés (Hartl and Clark. 1997, Hedrick 2000).

Ce travail vise à évaluer la taille efficace des populations d'*Amblyomma variegatum*, tique d'importance vétérinaire majeure en Afrique de l'Ouest. *Amblyomma variegatum* était jusqu'à très récemment l'espèce de tique la plus abondante retrouvée sur le bétail (Kabore et al. 1998, Farougou et al. 2007, Farougou et al. 2013) jusqu'à ce que *Rhipicephalus microplus* ait commencé à envahir cette zone (Madder et al. 2011). En plus des pertes directes qu'elle inflige au bétail, *A. variegatum* est le principal vecteur d'*Ehrlichia ruminantium*, l'agent de la cowdriose qui induit jusqu'à 80% de mortalité chez les ovins et les caprins sensibles. L'utilisation de pédiluves acaricides semble être le moyen le plus efficace pour protéger le bétail des effets de cette tique (Stachurski and Lancelot 2006). Cependant, l'efficacité à moyen et long terme de cette méthode dépend du potentiel d'*A. variegatum* à développer des résistances aux acaricides.

Nous avons donc développé un jeu de marqueurs microsatellites pour estimer la taille efficace de la population d'*A. variegatum* dans trois villages voisins du Burkina Faso. Comme l'échantillonnage portait sur deux générations de tiques, les tailles efficaces de population ont été estimées indépendamment par deux méthodes insensibles à l'hétérozygotie : la première est basée sur l'analyse du déséquilibre de liaison (Bartley et al. 1992) au sein de l'échantillonnage, tandis que la seconde utilise les changements de fréquence alléliques entre générations (Waples 1989).

Huit des 19 marqueurs microsatellites développés ont fourni de bons résultats d'amplification avec 4 à 24 allèles enregistrés par marqueur sur 216 tiques génotypées. Le polymorphisme au sein des échantillons était conforme à l'équilibre de Hardy-Weinberg pour quatre marqueurs, tandis qu'un des marqueurs est lié à un chromosome sexuel et que des allèles nuls ont été observés pour les autres. La présence d'allèles nuls aux marqueurs microsatellites est en effet un phénomène fréquemment rapporté chez les tiques Ixodidae (de Meeus et al. 2004, Koffi et al. 2006b, Noel et al. 2012, Van Houtte et al. 2013).

L'analyse en composantes principales, basée sur le polymorphisme de l'ensemble des loci, a confirmé l'existence de deux clusters distincts (Figure 26). Le premier axe a capturé une partie significative (32,7%,  $P=0,038$ ) de la variance génétique totale ; cet axe discrimine les échantillons de la génération parentale collectés en mai et juillet, de ceux correspondant à la descendance (collectés en novembre). Étant donné les faibles distances entre les villages impliqués dans l'étude (~10 km), il est possible que les hôtes domestiques de différents villages aient partagé certaines zones de pâturage à un moment où les larves de tiques cherchaient des hôtes sur lesquels se fixer. Cela a probablement favorisé la dispersion d'*A. variegatum* entre les villages de la zone étudiée, réduisant ainsi les différences de composition génotypique entre villages. Par conséquent, l'explication la plus probable du contraste de composition génotypique définissant le premier axe de l'ACP repose sur un fort impact de la dérive génétique entre générations (c'est-à-dire de petites tailles efficaces de populations). Cette conclusion est fortement soutenue par l'estimation, à l'aide des deux méthodes, de la taille efficace des populations pour *A. variegatum* qui va de deux à quelques dizaines d'adultes reproducteurs par village et par génération ( $2 \leq N_e \leq 90$ ).

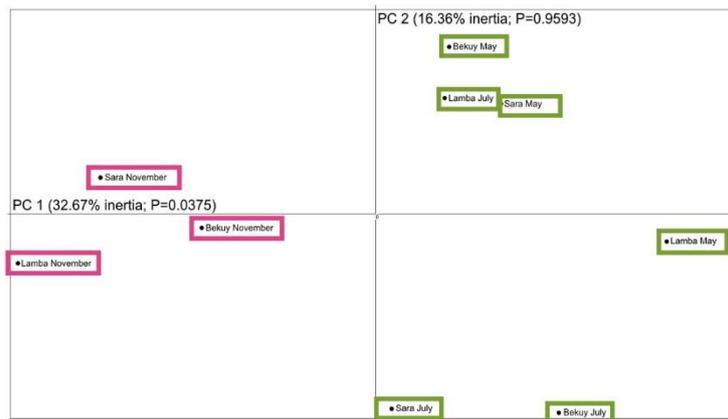


Figure 26 Analyse en composantes principales basée sur le polymorphisme des huit loci microsatellites pour *A. variegatum*. En vert, les points correspondant la génération parentale, en rose ceux correspondant à la descendance

On peut s'interroger sur la manière dont la biologie d'*A. variegatum* peut expliquer ces faibles tailles efficaces observées. L'absence de déviation par rapport à l'équilibre de Hardy Weinberg au sein des populations d'*A. variegatum* observée à quatre marqueurs statistiquement indépendants ne soutient pas l'hypothèse d'une distribution asymétrique du succès reproducteur des mâles (Norval et al. 1992). Les petites tailles efficaces ne sont pas non plus dues à une faible fertilité puisque les femelles d'*A. variegatum* pondent jusqu'à 20 000 œufs (Nuttall 1915, Barré 1989). Dès lors, la seule explication de ces faibles tailles de population effective doit être recherchée dans les faibles taux de survie au cours du cycle de vie d'*A. variegatum*. Les femelles *A. variegatum* une fois accouplées et pleinement gorgées, se détachent de leur hôte pour pondre leurs œufs sur le sol. Après l'éclosion des œufs, les larves attendent des hôtes sur lesquels se fixer en se regroupant à l'extrémité des tiges d'herbe, de sorte que de nombreux individus appartenant à la même fratrie peuvent se fixer sur le même individu-hôte. Dès lors, le rythme hétérogène de détachement des tiques aux stades nymphal et adulte (Stachurski and Adakal 2010), couplé aux mouvements des hôtes assurent deux cycles successifs de redistribution des fratries entre les individus-hôtes qui paissent sur les mêmes pâturages, c'est-à-dire entre infra-populations (Bush et al. 1997). Ces cycles de redistribution combinés aux faibles taux de survie de tous les stades présents sur la végétation (œufs, larves, nymphes, adultes) apparaissent donc comme l'explication la plus parcimonieuse pour expliquer les faibles tailles efficaces (Criscione and Blouin 2005).

Pour finir, nous avons évalué les implications de ces faibles tailles efficaces sur le succès des programmes de lutte contre les tiques, basés sur l'utilisation d'acaricides chimiques au Burkina Faso (Tableau 2). Le premier paramètre concerne la probabilité d'apparition par mutation d'un nouvel allèle conférant une résistance aux acaricides. Plus la taille efficace de la population est faible, plus cette probabilité est faible puisque le polymorphisme résultant de l'équilibre mutation/dérive est proportionnel à  $Ne \cdot \mu$  avec  $\mu$  le taux de mutation e.g. (Hartl and Clark. 1997, Hedrick 2000). Le second paramètre repose sur la probabilité qu'un nouvel allèle, conférant une résistance aux acaricides, puisse disparaître de la population de tiques avant d'être sélectionné lors de l'utilisation d'acaricides. Plus la taille efficace des populations est faible, plus la probabilité est grande que l'effet de la dérive génétique l'emporte sur celui de la sélection positive résultant de l'utilisation d'acaricides (Hartl and Clark. 1997, Hedrick 2000). A ce jour, les pressions de sélection causées par les acaricides chimiques restent plutôt faibles au Burkina Faso. En effet, la lutte contre les tiques s'y fait avec des stratégies variables (y compris par le retrait manuel et/ou l'application d'huile de vidange ou de bouse de vache sur le bétail) dans les systèmes traditionnels et à faible niveau d'intrants qui dominent la production animale dans ce pays (Adakal et al. 2013). Les faibles estimations de la taille efficace des populations d'*A. variegatum*

au Burkina Faso renforcent donc la forte probabilité que la dérive génétique surmonte l'effet de l'utilisation des acaricides sur le destin d'un mutant conférant une résistance aux acaricides. Cette situation contraste fortement avec celle de la tique du bétail *Rhipicephalus microplus* en Nouvelle-Calédonie. Sur cette île, de fortes tailles efficaces ( $Ne \sim 1\ 000$ ), couplées à un faible flux génique entre les troupeaux de bovins et à des pressions de sélection ( $s$ ) homogènement élevées ont été interprétées comme favorisant un scénario évolutif de résistance aux acaricides, dû à des événements récurrents de sélection positive locale de divers mutants nouvellement apparus conférant une résistance aux acaricides (Koffi et al. 2006a). La caractérisation de la résistance aux acaricides dans ces populations a permis de confirmer cette prédiction (Chevillon et al. 2007, Chevillon et al. 2013).

Ceci soutient donc une faible probabilité d'apparition et de sélection de mutants résistants aux acaricides chez *A. variegatum*, tout au moins en Afrique de l'Ouest. Il est intéressant de noter que l'absence de rapports sur la résistance aux acaricides dans les populations d'*A. variegatum* de Guadeloupe ou de Porto Rico, malgré des campagnes d'éradication intensives (Garris and Barre 1991), peut apporter un certain soutien à une telle prédiction, même si des études de génétique des populations réalisées dans ces régions sont encore nécessaires pour trancher ce point.

Tableau 2 Deux situations contrastées concernant la résistance aux acaricides chez les tiques dures

|   | <i>Amblyomma variegatum</i>          | <i>Rhipicephalus microplus</i> |
|---|--------------------------------------|--------------------------------|
| Pays  | Burkina Faso                         | Nouvelle Calédonie             |
| $Ne$  | $\leq 23$ par village par génération | $\sim 1000$ par troupeau       |
| Pression de sélection des acaricides ( $s$ )  | Modérée                              | Elevée                         |
| Probabilité d'apparition par mutation d'un nouvel allèle conférant une résistance aux acaricides $\propto Ne$                               | +                                    | +++                            |
| Probabilité qu'un allèle conférant une résistance aux acaricides disparaisse de la population de tiques $\propto 1/Ne$ sauf si $s \gg 1/Ne$ | +++                                  | +                              |
| Résistance aux acaricides observée  | Non rapportée                        | Fréquemment rapportée          |

*Stéphanie Jacquet, étudiante en master 2 et Elise Renier ont participé à ce travail par la mise au point et la validation des marqueurs microsatellites. Ce travail a donné lieu à une publication : n°30*

### 2.3.2. *Amblyomma variegatum*, une tique invasive

*Le rôle des activités liées à l'élevage bovin dans la colonisation de nouveaux territoires*

La distribution d'*A. variegatum* sur plus de 30 pays africains en fait l'espèce du genre *Amblyomma* dont l'aire de distribution ancestrale est la plus large (Cumming 1999). Cette aire de distribution englobe une zone subsaharienne allant du Sénégal à l'Éthiopie, à l'Afrique centrale, ainsi qu'une grande partie de l'Afrique orientale (Walker and Olwage 1987). Cette tique colonise une grande variété d'environnements et de zones climatiques, de la forêt pluviale aux zones montagneuses plus tempérées, des savanes aux steppes sahéliennes (Walker et al. 2003). Sa limite nord de distribution serait aux environs de l'isohyète 500 millimètres suggérant qu'elle tolère mal des pluviométries inférieures. Le fait qu'elle parasite autant des ruminants sauvages africains que des ruminants domestiques suggère que cette tique fut très probablement un parasite de ruminants africains qui a réussi à élargir sa gamme d'hôtes aux espèces domestiques. Aucune donnée historique ne permet de

préciser où cet élargissement du spectre d'hôtes aux ruminants domestiques s'est fait. Les analyses phylogénétiques et phylogéographiques apportent toutefois quelques informations à ce sujet. Une première étude, basée sur les séquences de deux marqueurs mitochondriaux (12SDNA et D-Loop-DL) et d'un marqueur nucléaire (ITS2) distingue une lignée à distribution « est-africaine » d'une lignée à distribution « ouest-africaine » (Beati et al. 2012). Les travaux que nous avons réalisés sur deux marqueurs mitochondriaux (16SrDNA et Cytb) permettent de distinguer une lignée à distribution « est-africaine » d'une lignée que l'on peut qualifier de « mondiale », car présente dans tous les échantillons analysés (Figure 27).

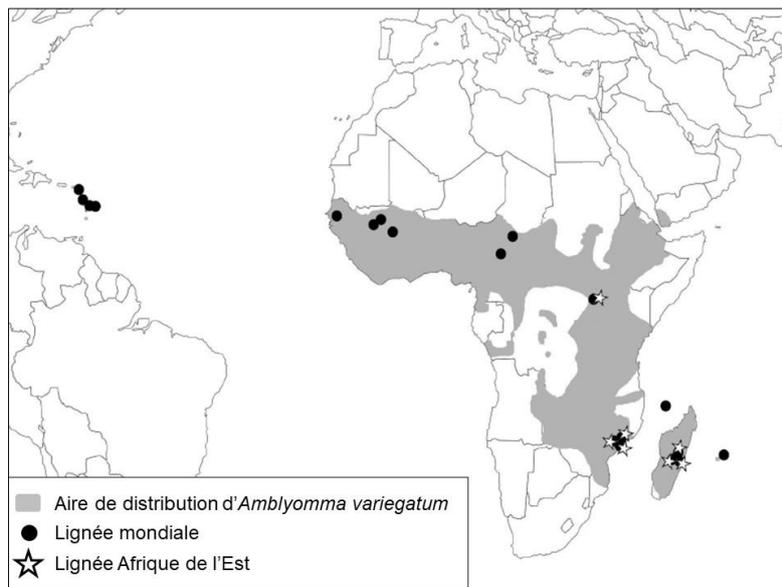


Figure 27 Aires de distribution d'*A. variegatum* et des lignées mitochondriales (16SrDNA et Cytb) identifiées

Ces résultats suggèrent que les deux premières histoires du développement de l'élevage bovin correspondant à la diversification des taurins africains à l'Ouest et à l'introgression de génome « zébu » à l'Est (Hanotte et al. 2002) ont contribué à la diversification d'*A. variegatum* ; cela impliquerait donc que le passage d'*A. variegatum* sur les bovins domestiques ait eu lieu en tout début de l'histoire africaine de l'élevage bovin (Figure 28).



Figure 28 Origine et routes de migration des bovins domestiques en Afrique (Source : Unité graphique, ILRI, 2006).

La quasi-omniprésence d'*A. variegatum* en Afrique couplée à sa biologie (grande prolificité et capacité à survivre en diapause dans l'attente d'un hôte favorable) et à son affinité avec le bétail domestique a facilité sa diffusion en dehors de son continent d'origine (Estrada-Pena et al. 2007). Dans l'Atlantique, cette tique est décrite au Cap-Vert et aux Caraïbes. L'histoire de l'élevage suggère qu'elle fut introduite aux Caraïbes avec l'importation de bétail d'Afrique de l'Ouest par le commerce triangulaire. En effet, du milieu du XVIII<sup>ème</sup> à la fin du XIX<sup>ème</sup>, le commerce triangulaire entre les ports d'Europe, les comptoirs d'Afrique de l'ouest (Sénégal et Golfe de Guinée) et les colonies américaines s'est accompagné d'importation aux Antilles de bovins originaires d'Afrique de l'ouest (Maillard and Maillard 1998). L'analyse phylogéographique de Beati et al. (Beati et al. 2012) le confirme : les mitochondries des tiques des Caraïbes appartiennent bien à la lignée « ouest-africaine ». La Guadeloupe a été la première île colonisée, suivie de Marie-Galante, Antigua, puis de la Martinique en 1948. Entre 1967 et 1988, *A. variegatum* a colonisé la quasi-totalité des Petites Antilles ainsi que Porto-Rico (Grandes Antilles). Cette dernière phase de colonisation s'explique, là encore, par les mouvements de bétail entre îles. On évoque cependant, comme facteur de dispersion supplémentaire, la dispersion par un oiseau ayant proliféré dans les décennies 1970-1980 : le héron garde-bœufs, *Bubulcus ibis* (Corn et al. 1993).

L'histoire de l'élevage suggère une multiplicité d'opportunités d'introduction d'*A. variegatum* dans les îles de l'océan Indien au cours de la diffusion de bovins hybrides taurins x zébus amorcée dès le VII<sup>ème</sup> siècle (Rafolo 1987-1988, Boivin et al. 2013). Les données historiques demeurent peu informatives. *A. variegatum* est signalée pour la première fois à Madagascar en 1899 (citation de Neumann par (Uilenberg et al. 1979)), sur l'île Maurice fin XIX<sup>e</sup> (citation de Neumann par (Barre and Morel 1983)) et sur l'île de la Réunion en 1949 (Gillard 1949). Elle est signalée plus tard aux Comores (Du Plessis et al. 1989) et à Mayotte (Camus et al. 1998). En dépit de conditions climatiques favorables, elle ne semble pas s'être implantée à Rodrigues (Barre and Morel 1983). La coexistence des lignées mitochondriales « Afrique de l'Est » et « mondiale » dans les populations malgaches confirme bien l'hypothèse d'une introduction de cette tique depuis l'Afrique orientale.

#### *Structuration des population d'Amblyomma variegatum dans l'Océan Indien en lien avec les mouvements de leurs hôtes bovins*

Au niveau local, les deux lignées décrites précédemment se retrouvent en sympatrie sur Madagascar alors que la lignée "mondiale" se retrouve assez exclusivement sur les autres îles de l'Océan Indien (La Réunion, Mayotte et les Comores). Une plus grande variabilité génétique (une diversité nucléotidique et haplotypique élevée et une valeur D de Tajima positive) est observée à Madagascar, indiquant des tailles de population importantes et stables. Alors que cette tique n'a pas été décrite à Madagascar avant 1899, l'introduction d'*A. variegatum* est probablement beaucoup plus ancienne et concomitante à l'introduction du bétail sur cette île (voir ci-dessus). Cette introduction ancienne suivie de plusieurs événements de réintroduction successifs pourrait avoir conduit à cette forte diversité génétique. Un patron similaire est décrit pour le moustique *Aedes aegypti* à Madagascar (Delatte et al. 2011). A l'inverse, une variabilité génétique réduite est observée sur les autres îles. Ceci peut être causé par une introduction plus récente de la tique dans ces îles et par des goulets d'étranglement génétiques répétés (faible nombre de tiques introduites, moins de réintroductions ou de plus de traitements acaricides répétés), conduisant à des tailles de population plus petites et plus sensibles à la dérive génétique. A Madagascar, il a été observé que la lignée " mondiale " était présente dans toute l'île alors que la lignée " est-africaine " n'a été détectée que dans le centre et l'est de l'île qui sont les zones de Madagascar où les précipitations sont les plus importantes (Figure 29). On a émis l'hypothèse que la lignée "mondiale" pourrait avoir une plus grande plasticité écologique lui permettant de se développer dans des conditions plus variables. Ceci pourrait expliquer la prédominance des tiques appartenant à cette lignée dans les autres îles de l'Océan Indien.

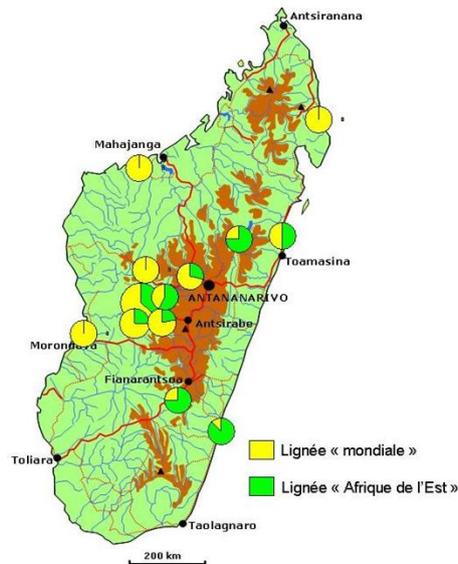


Figure 29 Répartition des lignées « mondiale » et « Afrique de l'est » d'*A. variegatum* à Madagascar, déterminées par séquençage des gènes mitochondriaux 16SrDNA et Cytb. La taille des cercles est proportionnelle au nombre d'individus analysés.

L'analyse de la structuration entre les îles du sud-ouest de l'Océan Indien à l'aide des marqueurs microsatellites et mitochondriaux montrent l'existence de flux géniques entre populations de tiques des différentes îles. En effet, le bétail de La Réunion et de Maurice a été essentiellement importé de Madagascar, il en va de même pour les Comores jusque dans les années 2000. Lorsque l'on regarde les paires de populations significativement différenciées, on observe que ce sont des paires concernant essentiellement Madagascar avec l'archipel des Comores. Les analyse de variance moléculaire locus par locus (AMOVA) (Excoffier et al. 1992) testant la différenciation entre Madagascar et les îles des Comores ne se révèlent significatives que pour les marqueurs microsatellites. Ceci semble montrer moins de flux génique récent entre ces deux zones. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que si les Comores importaient leurs bovins de Madagascar, elles les importent depuis une dizaine d'année depuis la Tanzanie. En effet si l'on considère les mouvements de bétail dans l'Océan Indien, la plupart des bovins sont transportés de Tanzanie, Mohéli ou Anjouan vers la Grande Comore, où d'importants abattages de bétail ont lieu lors des mariages traditionnels appelés "grands mariages". Le transport illégal de bétail entre îles est fréquent, mais beaucoup plus difficile à appréhender et joue également un rôle dans les mouvements de tiques. Le test d'isolement par la distance démontre que la distance géographique entre populations n'est pas liée à la différenciation génétique. La dispersion des tiques ne s'effectue donc pas de proche en proche autour du point d'introduction mais elle serait liée à d'autres facteurs comme la dispersion de ses hôtes (hôtes bovins ou oiseaux) (Barre and Garris 1990). Cependant, on observe que la différenciation génétique augmente graduellement avec la distance géographique bien que non significativement, ce qui laisserait quand même penser que les échanges sont plus fréquents entre îles proches qu'entre zones géographiquement plus éloignées.

A Madagascar, l'étude de la structuration génétique des populations d'*A. variegatum* à l'aide des marqueurs microsatellites nous a permis, comme en Afrique de l'Ouest, la faible taille efficace des populations de cette tique. Elle met également en évidence une structuration importante des populations de tiques ainsi que des flux géniques limités. Le patron de différenciation observé s'est montré très hétérogène et ne peut pas s'expliquer par des facteurs simples comme la distance ou les grandes barrières géographiques. Elle est certainement le fruit de l'interaction complexe de différents facteurs écologiques, comme le type de paysage, les facteurs climatiques ou anthropiques liés aux pratiques d'élevage (partage des pâtures, usages d'acaricides, achats de bovins...).

## Congruence des patterns phylogéographiques entre la tique *Amblyomma variegatum* et la rickettsie *Ehrlichia ruminantium* ?

De nombreux facteurs influencent l'épidémiologie des maladies à transmission vectorielle. Les facteurs environnementaux, qui peuvent être fortement altérés par les activités humaines ont un impact direct sur les systèmes pathogènes-vecteurs. La création de voies de communications, de routes commerciales ont permis les déplacements des hommes mais aussi de leurs animaux domestiques, de leurs pathogènes et de leurs vecteurs. Ces interactions complexes vont déterminer si oui ou non les vecteurs et les pathogènes vont montrer des structurations semblables. C'est pourquoi en parallèle à l'étude phylogéographique d'*A. variegatum*, une démarche similaire a été menée sur la rickettsie *E. ruminantium* en utilisant une approche MLST (multilocus sequence typing) sur cinq gènes de ménage (Adakal et al. 2009, Adakal et al. 2010).

L'analyse MLST réalisée sur *E. ruminantium* permet de mettre en évidence deux grands groupes, un groupe mondial incluant la Caraïbe, la zone Océan Indien, l'Afrique de l'Ouest et du Sud et un second groupe qui se limite à l'Afrique de l'Ouest (Figure 30). Cette étude révèle également des événements répétés de recombinaison entre souches d'*E. ruminantium*, ce qui suggère que ces événements ont probablement joué un rôle important dans le maintien de la diversité génétique et l'évolution d'*E. ruminantium*.

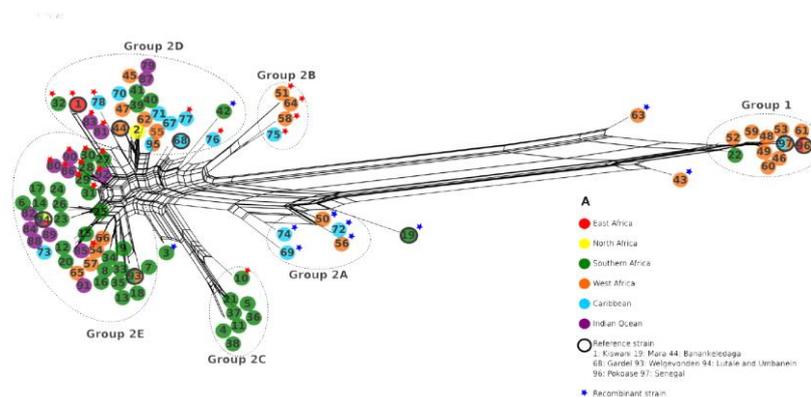


Figure 30 Réseau en split decomposition de 97 génotypes d'*E. ruminantium* obtenus à partir de cinq gènes de ménage concaténés. Les souches sont codées par couleur selon l'origine géographique décrite dans la légende. Les souches de référence sont identifiées par des cercles noirs. Les souches recombinantes sont marquées d'une étoile bleue.

Nous pouvons faire l'hypothèse que les mouvements de bétail anciens (plus de 400 ans) et plus récents (moins de 400 ans) ont façonné la diversité d'*E. ruminantium* en créant différents groupes et sous-groupes génétiques et en facilitant la recombinaison entre les différentes souches. L'ensemble des vecteurs actuellement connus d'*E. ruminantium* sont des espèces africaines d'*Amblyomma* (Voltzit and Keirans 2003) et ces espèces ont comme hôtes principaux de grands mammifères sauvages africains (Voltzit and Keirans 2003) ; il est donc raisonnable d'en déduire que des souches d'*E. ruminantium* bien adaptées circulaient en Afrique depuis des milliers d'années, avant l'introduction des premiers ruminants domestiques. Plusieurs études ont rapporté une rupture génétique entre zones biogéographiques Ouest et Est chez un certain nombre d'ongulés africains (Lorenzen et al. 2012) qui peut éventuellement contribuer à expliquer la grande distance génétique entre le Groupe 1 et le Groupe 2 observée entre populations d'*E. ruminantium*. En raison de l'échantillonnage limité dans certaines régions (notamment en Afrique centrale et orientale) et de l'absence d'une horloge moléculaire bien établie pour *E. ruminantium* (Hughes and French 2007), ainsi que de la présence d'événement de recombinaison, il n'est pas possible d'obtenir de dater de la divergence entre les souches et les groupes génétiques d'*E. ruminantium*. Une différenciation significative a également été observée à l'aide des marqueurs mitochondriaux *Cyb* et *16SrDNA* pour *A. variegatum* entre l'Afrique

de l'Ouest et l'Afrique de l'Est, probablement en raison des faibles mouvements de faune dus aux grandes barrières géographiques telles que les déserts et les forêts denses.

L'introduction et l'expansion de *Bos taurus*, des petits ruminants et de *Bos indicus* en Afrique il y a entre 8000 et 2500 ans avant J.-C. (Hanotte et al. 2002, Ajmone-Marsan et al. 2010) ont exposé pour la première fois des populations naïves de ruminants domestiqués aux espèces africaines d'*Amblyomma* et aux souches d'*E. ruminantium*. Le passage des souches d'*E. ruminantium* des espèces sauvages africaines aux ruminants domestiques a été associé à une mortalité élevée et a déclenché un processus d'adaptation hôte-pathogène qui aurait causé des phénomènes de recombinaison intense entre les souches d'*E. ruminantium*. Les données archéologiques et génétiques sur l'origine et l'expansion des populations de ruminants domestiques sur le continent africain soutiennent fortement l'existence de routes migratoires Est-Ouest, Ouest-Est (moins courantes), Nord-Sud et plus récemment Sud-Nord (Hanotte et al. 2002, Ajmone-Marsan et al. 2010). Ces mouvements migratoires d'hôtes domestiqués soutiendraient la possibilité d'un flux génétique d'agents pathogènes à travers ces routes. Au cours du dernier millénaire, le développement de l'agriculture et de la technologie du fer a conduit à un comportement plus sédentaire des communautés bantoues sub-sahariennes, avec pour conséquence une réduction progressive des migrations transcontinentales (Blench and MacDonald 2006). Ce fait pourrait avoir contribué à l'isolement progressif des populations de ruminants domestiques et, par conséquent, à la réduction du flux génétique continental des vecteurs et des agents pathogènes.

Les mouvements de bétail, les contacts avec la faune sauvage mais aussi la dispersion des tiques *Amblyomma* ont probablement façonné la diversité génétique d'*E. ruminantium*. Il est intéressant de noter que la diversité génétique de la tique vectrice *A. variegatum* (Figure 31) semble suivre un schéma similaire à celui d'*E. ruminantium* comme décrit plus haut (Beati et al. 2012, Stachurski et al. 2013). Les groupes génétiques d'*A. variegatum* semblent généralement correspondre aux groupes génétiques d'*E. ruminantium* trouvés dans cette étude mais aussi dans des études plus anciennes (Allsopp and Allsopp 2007, Vachiéry et al. 2008, Nakao et al. 2011).

Dans la Caraïbe et l'Océan Indien, il est très probable qu'*A. variegatum* et *E. ruminantium* aient été introduits simultanément avec le bétail. Dans la Caraïbe, des études de la diversité génétique des bovins ont montré une correspondance entre la diversité génétique et la domestication historique (importation d'Afrique de l'Ouest) des bovins de cette région (Magee et al. 2002). De même, la diversité génétique des souches d'*E. ruminantium* (Vachiéry et al. 2008) et nos résultats a permis de relier les types de séquences à plusieurs origines en Afrique, suggérant ainsi que les souches ont été introduites avec *A. variegatum* au XIXe siècle.

Dans les cas où un sous-groupe est dominé par des souches issues de certaines régions géographiques mais est rarement présent ailleurs, l'explication la plus parcimonieuse est que les souches situées de façon atypique sont le résultat du transport d'une souche dont l'ascendance se situe dans la région qui prédomine dans le groupe. Pour *A. variegatum* (Figure 31), cette explication semble en cohérence avec les données historiques connues et précédemment décrites.

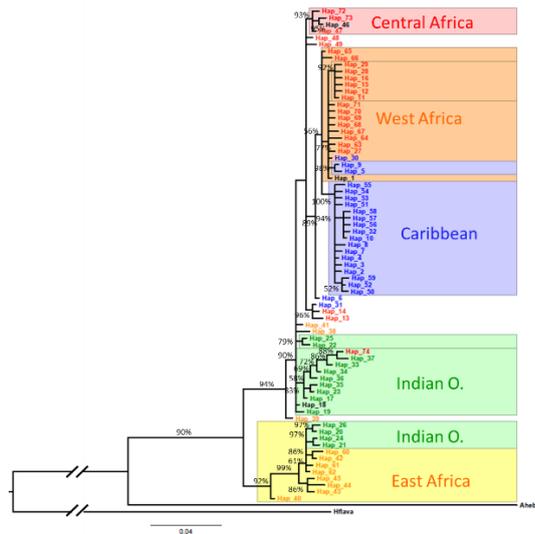


Figure 31 Arbre phylogénétique inférence bayésienne des gènes concaténés Cytb et 16SrDNA pour *A. variegatum*

Cependant pour *E. ruminatum*, l'origine du sous-groupe 2D (Figure 30) semble déroutante car ce groupe est constitué de souches provenant des quatre grandes régions géographiques échantillonnées ayant toutes la même fréquence. Cependant, si l'on exclue les séquences clonales (39, 40, 41 et 79, 87) et recombinantes (42 et 32) provenant d'Afrique australe et de l'océan Indien, la majorité de la diversité génétique de ce sous-groupe se trouve en Afrique de l'Ouest et dans les Caraïbes. Comme le transport du bétail était probablement unidirectionnel vers les Caraïbes depuis l'Afrique de l'Ouest (Hanotte et al. 2002), nous pouvons considérer que le sous-groupe 2D aurait une origine ancestrale ouest-africaine et que la présence de souches d'Afrique australe et de l'océan Indien au sein de ce groupe peut être due à un mouvement plus récent des types de souches de l'Afrique de l'Ouest vers ces régions. Une hypothèse pourrait être l'existence d'échanges commerciaux entre les colonies portugaises et les postes de traite, situées tout le long des côtes africaines, au cours des 17e et 18e siècles. Cela pourrait également expliquer qu'une souche originaire de Sao Tomé (souche 54) se soit regroupée avec des souches d'Afrique australe, de l'océan Indien et des Caraïbes au sein du groupe 2E (Figure 30).

En conclusion, bien que la congruence soit imparfaite entre les patrons phylogéographiques d'*A. variegatum* et d'*E. ruminatum*, nous avons vu que nous pouvons mettre en évidence une histoire commune à travers les mouvements du bétail en relation avec les activités humaines. Leur histoire évolutive est le résultat d'interactions complexes entre l'hôte mammifère, le pathogène et le vecteur en raison des multiples étapes évolutives nécessaires à leur adaptation mutuelle.

En Afrique comme dans les Antilles, *A. variegatum* n'est pas observée dans des zones pourtant décrites comme favorables par la modélisation de sa niche climatique. Et dans certaines de ces zones, il existe même d'autres espèces de tiques du genre *Amblyomma* en présence desquelles *A. variegatum* n'a jamais été retrouvée. Aux Antilles par exemple, la répartition d'*A. variegatum* ne se superpose pas à celle d'*A. cajennense* (Camus and Barre 1995). Dans ce contexte insulaire où les îles limitent l'extension naturelle des espèces, de nombreuses questions sur les habitats favorables, le risque d'extension des espèces, éventuellement l'une au détriment de l'autre, se posent. En Afrique, au Mozambique et au Zimbabwe, les répartitions d'*A. variegatum* et d'*A. hebraeum* semblent se juxtaposer : la limite méridionale de l'aire de répartition de la première correspond à la limite septentrionale de la seconde. Une étude récente menée dans notre unité sur les distributions de ces espèces parapatriques a montré qu'en plus des facteurs environnementaux, les interactions biotiques contribuaient à la position des limites observées, notamment dans les zones à faibles gradients environnementaux (Bournez et al. 2015). Ces différences de répartition des espèces d'*Amblyomma* et, pour l'Afrique, cette apparente exclusion interspécifique résultent donc d'un ensemble de facteurs liés à la bio-écologie des tiques, des barrières naturelles (facteurs environnementaux favorisant une espèce par rapport à l'autre),

l'existence d'une compétition interspécifique, différences de spectre d'hôtes et de répartition des hôtes, pratiques d'élevages, etc. Ces facteurs ont en réalité été très peu étudiés. Une étude de génétique des populations sur *A. variegatum* et *A. hebraeum* réalisée en parallèle, dans la zone de parapatrie permettrait d'investiguer, l'importance d'une partie de ces facteurs

*Ce travail a été financé par le projet DIGEERAV-OI et par la région Languedoc-Roussillon via le projet « Chercheurs d'avenir » de J. Bouyer. Stéphanie Jacquet, étudiante en master 2, Marlène Dupraz, étudiante en master 1 et Antony Chung You Chong, étudiant en licence professionnelle ont réalisé l'étude de la structuration d'*A. variegatum* dans l'Océan Indien. Les travaux sur *E. ruminantium* ont été réalisés en collaboration avec l'équipe bactériologie / centre de recherche et de veille Caraïbe.*

*Ce travail a fait l'objet de deux publications : n°20, 25 et du chapitre d'ouvrage sur les tiques invasives.*

2.3.3. Structuration génétique des populations d'*Amblyomma hebraeum* au Zimbabwe : interface entre faune sauvage et bétail domestique.

Au Zimbabwe, deux espèces d'*Amblyomma* coexistent, *A. hebraeum* et *A. variegatum*, *A. hebraeum* étant l'espèce la plus largement répandue. Une récente étude a montré qu'*A. variegatum* est beaucoup plus rare et a une distribution limitée à la partie nord du pays alors qu'*A. hebraeum* est plus largement répandue dans le Sud du pays avec une limite nord de distribution correspondant au plateau central (Norval et al. 1994). Cette espèce était considérée comme présente de manière endémique bien avant l'introduction de la cowdriose au Zimbabwe dans les années 30. Suite à l'introduction de cette maladie, des mesures de limitation des mouvements de bétail et des mesures de lutte antivectorielle ont été mises en place. A partir des années 80, une période d'instabilité politique, a conduit à une recrudescence de la tique et de la maladie (Norval et al. 1994). Malgré la reprise de mesures de contrôle, *A. hebraeum* a vu son aire de répartition s'étendre à des régions a priori peu favorables à cette espèce et dans lesquelles elle n'avait encore jamais été décrite. Les fluctuations de l'aire de répartition d'*A. hebraeum* au Zimbabwe semblent donc très liées à l'intensité des mesures de luttes mises en place pour protéger les bovins domestiques (Sungirai et al. 2015). *A. hebraeum* est une tique présentant une grande diversité d'hôtes, à la fois domestiques et sauvages. On peut donc s'interroger sur le rôle de la faune sauvage en tant que réservoir de la tique en cas de forte pression acaricide.

Afin de vérifier cette hypothèse, une étude de génétique des populations a été menée, à l'aide de marqueurs microsatellites développés pour cette espèce. Des marqueurs microsatellites ont été développés pour cette étude. Un jeu de donnée a été généré à partir d'*A. hebraeum* collectés dans la région du parc national de Gonarezhou au Zimbabwe sur buffles sauvages et bétail domestique ainsi dans une zone distante de 400 km sur bétail domestique et sur faune sauvage. Dans un premier temps, la validité des marqueurs développés a été vérifiée et leurs biais ont été évalués et 7 loci ont été retenus pour la suite de ce travail. Les premiers résultats semblent montrer une absence de structuration à grande échelle ni d'influence de l'espèce hôte sur laquelle la tique a été récoltée. Il semble y avoir une légère structuration à plus petite échelle, probablement en fratries, peut-être due à des traitements acaricides réguliers. Cela doit encore être confirmé par l'utilisation d'une approche individuelle au sein de chaque zone d'étude par le calcul de distance d'apparement.

*Ce travail fait partie du travail de thèse de Musa TIVAPASI, à l'Université du Zimbabwe. Anastasia Balmefrezol, stagiaire en IUT a également contribué à ce travail.*

### 2.3.4. Invasion biologique : Confirmation de la présence de *Hyalomma marginatum* en France continentale

En France, la seule espèce de tique appartenant au genre *Hyalomma* considérée comme établie en France est *H. scupense* dans le sud-ouest (Morel 1969, Macaigne and Perez-Eid 1993) et plus récemment en Corse (Grech-Angelini et al. 2016). La France continentale était considérée comme exempte d'autres espèces de tiques appartenant au genre *Hyalomma*. *H. lusitanicum* a été signalé en 1954 en Camargue mais n'a plus été détectée par la suite (Rageau and Mouchet 1970). Concernant *H. marginatum*, de rares données historiques signalent la présence de cette tique dans le sud de la France, entre les années 1940 et 1980, mais seul un petit nombre peut être considéré comme valide (Morel 1969, Perez-Eid 2007). Certains de ces signalements résultent probablement d'une identification incorrecte ou bien il s'agissait uniquement de stades nymphaux collectés sur des oiseaux migrant depuis l'Afrique. En effet, la découverte de nymphes indique une possible introduction de l'espèce de tique par les mouvements d'oiseaux mais pas nécessairement son établissement.

Plusieurs campagnes d'échantillonnage ont été menées sur des chevaux et des oiseaux de 2007 à 2016, dans des sites représentatifs d'habitats écologiques différents. L'identification des tiques a été réalisée en combinant de l'identification morphologique et du typage moléculaire à l'aide des gènes 12SrDNA et COI.

L'analyse en Neighbor-joining sur la base des deux marqueurs moléculaires a permis d'assigner tous les spécimens de tiques groupes distincts (Figure 32) correspondant à *H. marginatum* (15 adultes), *H. rufipes* (2 nymphes) et à *H. scupense* (un adulte). La divergence génétique intra-groupe observée va de 0 à 0,9% et de 0 à 3% (Fig. 32 A et B), pour 12S et COI respectivement, ce qui est cohérent avec les études précédentes (Lv et al. 2014). Elle ne chevauche pas la divergence génétique inter-groupe qui s'étend de 1,9% à 13,3% et de 3,7% à 13,3%, ce qui confirme la fiabilité de l'identification moléculaire.

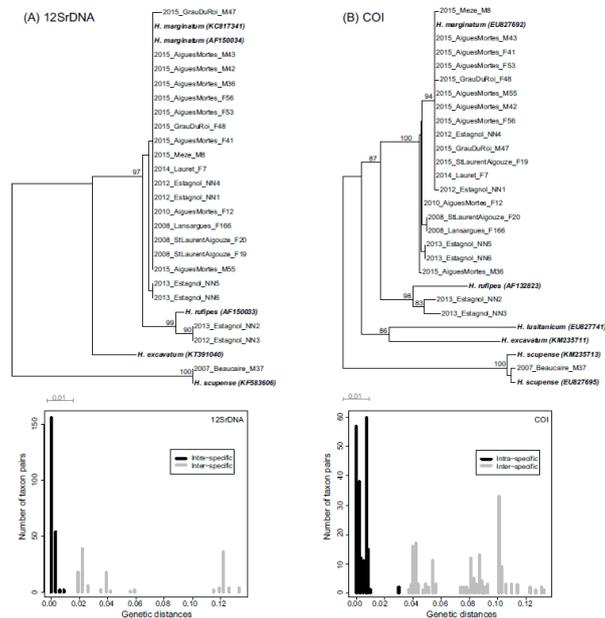


Figure 32 Arbres phylogénétiques en Neighbor-joining obtenues à partir des tiques *Hyalomma* collectés de 2007 à 2015 dans le sud de la France et histogrammes correspondants des distances génétiques intraspécifiques (noir) et interspécifiques (gris), pour 12S (A) et COI (B) respectivement.

Les sites positifs pour *H. marginatum* sont situés soit dans les zones humides de la Camargue, soit dans les garrigues plus sèches de la campagne autour de Montpellier, indiquant ainsi une extension effective de l'aire de répartition de cette espèce en dehors des points d'introduction présumés qui correspondent aux zones humides. Le fait que des tiques adultes aient été trouvées sur des animaux

résidents, que des adultes de *H. marginatum* aient été collectés aux mêmes sites sur plusieurs années successives et que des tiques aient été collectées sur les mêmes espèces d'hôtes (chevaux) sur des sites géographiquement éloignés, permet de confirmer l'établissement de populations reproductrices de *H. marginatum* dans le sud de la France. La détection de nymphes de *H. marginatum* et *H. rufipes* au printemps sur plusieurs espèces d'oiseaux connus pour hiverner en Afrique ou dans la péninsule ibérique, permet d'établir que les tiques du genre *Hyalomma*, et leurs pathogènes associés, peuvent être introduits régulièrement en France continentale par les migrations d'oiseaux.

Depuis 2016, des campagnes régulières de surveillance et de collectes de *H. marginatum* ont été menées, qui ont permis de générer une carte de distribution géographique actualisée pour *H. marginatum* dans le sud de la France continentale (Figure 33). Ces données de présence et d'absence collectées, ainsi que le nombre moyen de tiques par animal examiné comme estimation de l'abondance, ont été utilisées pour développer un modèle statistique qui vise à donner de nouvelles indications sur les facteurs environnementaux limitant ou facilitant l'établissement de *H. marginatum*, à une résolution spatiale plus fine que les précédents modèles de niche écologique et en utilisant de multiples paramètres décrivant précisément le climat et l'habitat ((Bah et al. 2021), article soumis).

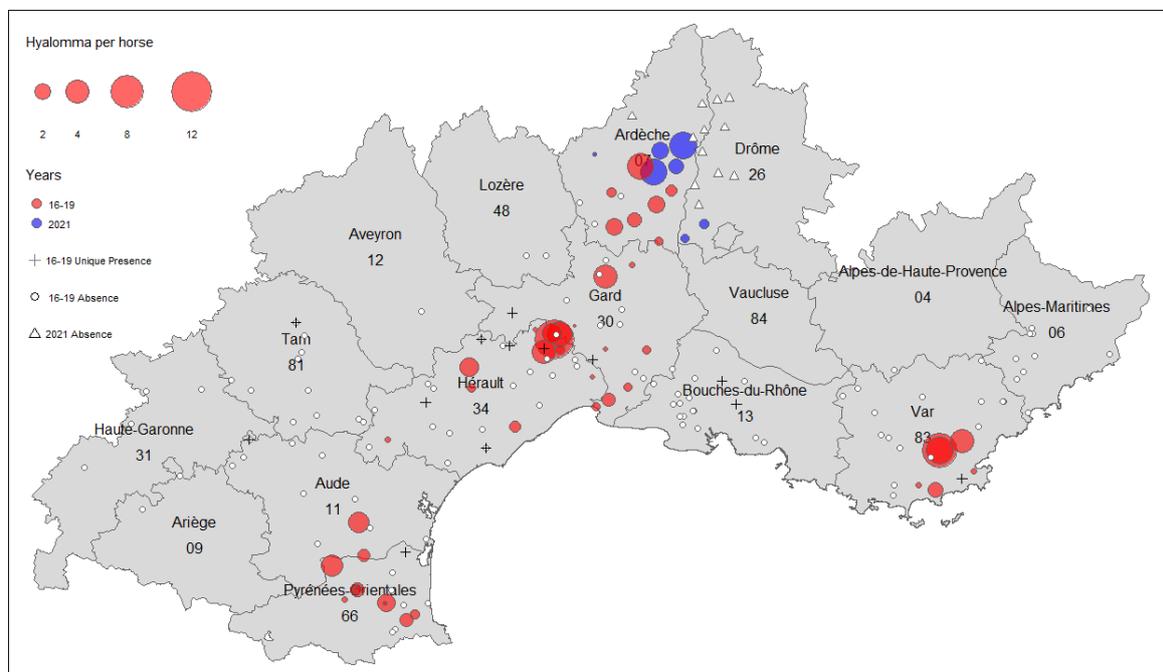


Figure 33 Localisation des sites d'échantillonnage de *Hyalomma marginatum* dans 14 départements français. Les cercles colorés représentent les sites où *H. marginatum* est présente et la taille correspond au nombre moyen de *H. marginatum* par cheval dans chaque structure équestre. Les cercles rouges correspondent aux enquêtes menées de 2016 à 2019, tandis que les cercles bleus correspondent à l'enquête de 2021. Les cercles blancs correspondent aux sites où *H. marginatum* a été considéré comme absent lors des enquêtes de 2016 à 2019 et les triangles blancs pour l'enquête 2021. Les croix noires représentent les sites où un seul spécimen de *H. marginatum* a été trouvé.

*Ce travail a fait l'objet d'une publication : n°26 et d'une publication soumise*

## Perspectives de recherche

---

Je compte au cours du prochain quadriennal continuer à développer mes questions de recherche sur les modèles tiques durs et *Culicoides*. En effet, ces vecteurs impliqués dans la transmission de maladies sont d'intérêt à la fois pour le Sud mais aussi pour le Nord et ces questions de recherche s'intègrent parfaitement dans l'approche One Health développée au sein de l'UMR ASTRE. En effet, dans un contexte de changement global, où l'interconnexion géographique est croissante (par la mobilité animale et les mouvements humains) et où les changements redistribuent les habitats et les climats à différentes échelles, de nombreuses maladies animales et zoonotiques voient leurs aires de distribution se modifier rapidement. Ces changements sont très souvent associés à des processus d'émergence et d'endémisation. De plus, la thématique « Surveillance et contrôles des vecteurs et maladies vectorielles » constitue l'un des grands défis identifiés dans le nouveau projet scientifique de l'unité, un accent étant mis sur les études et modélisations de l'émergence et de diffusion de vecteurs et des maladies vectorielles, entre autres en lien avec les invasions biologiques. Leur réalisation à plus ou moins long terme va cependant fortement dépendre des financements obtenus et ainsi que des partenariats qui pourront être développés afin de pouvoir obtenir les échantillons biologiques nécessaires à ces études.

### 1. Expansion et adaptation de la tique *Hyalomma marginatum* sur le littoral méditerranéen français

Sur le modèle tique dure, je compte me concentrer sur les tiques du genre *Hyalomma*. Comme nous l'avons vu plus haut, nous avons observé récemment pour l'espèce *H. marginatum* une extension vers le nord de son aire de répartition spatiale dans le bassin méditerranéen. Endémique dans plusieurs pays méditerranéens du Sud, du Maghreb à la péninsule ibérique et à l'Est du bassin méditerranéen (Turquie, Balkans), son aire de répartition est en train de s'étendre progressivement vers le nord et vers l'ouest et le centre de l'Europe sous l'effet du changement climatique, des mouvements d'animaux et des déplacements internationaux (Figure 7). Cette espèce était absente des régions du sud de l'Hexagone jusqu'à 2015. Depuis cette date, *H. marginatum* s'est établie sur le littoral méditerranéen français (Vial et al. 2016), notamment dans certaines zones de la région Occitanie.

#### 1.1. Un imbroglio taxonomique

Les tiques du genre *Hyalomma* sont largement répandues dans les régions géographiques afrotropicales, paléarctiques et orientales et les plus anciens restes fossiles ressemblant à *Hyalomma* ont été trouvés dans la région baltique (datant de 35-50 millions d'années (de la Fuente 2003)). Dans la famille des Amblyommidae, les genres *Hyalomma* et *Rhipicephalus* sont les genres ayant divergé le plus récemment (Perez-Eid 2007). Ce sont les deux genres où l'on rencontre le plus de diversité cryptique ce qui pourrait être la conséquence de divergences entre lignées très récentes. En effet, ce genre présente une grande variabilité morphologique intra-spécifique, des phénomènes d'hybridation inter-spécifiques (Rees et al. 2003) ainsi que la présence de complexes d'espèces cryptiques. L'identification morphologique des tiques du genre *Hyalomma* est donc particulièrement complexe et est souvent source d'erreurs (Estrada-Peña et al. 2017). Plus particulièrement les stades immatures de ces espèces posent des difficultés considérables d'identification au niveau spécifique. Afin de réaliser une identification morphologique au genre, il est souvent nécessaire de garder les nymphes gorgées en vie et de leur permettre de muer au stade adulte. Ces étapes sont longues et nécessitent une forte expertise taxonomique.

Depuis 2016, mes collègues de l'UMR ASTRE ont effectué plusieurs campagnes de collecte de tiques *H. marginatum* dans plus d'une centaine de centres équestres et élevages de chevaux autour du bassin

méditerranéen (Stachurski and Vial 2018). Si l'identification morphologique de la plupart des spécimens au stade adulte a été réalisée correctement, un doute demeure sur certains spécimens présentant à la fois des caractéristiques morphologiques propres à *H. marginatum* et d'autres propres à *H. scupense* (Stachurski F., communication personnelle). Après séquençage du gène COI, ces individus se sont révélés appartenir à l'espèce *H. scupense*. Afin d'identifier la distribution spatiale actuelle de *H. marginatum* et d'évaluer son expansion, de nouvelles collectes seront réalisées entre avril et juin 2022 sur les centres équestres déjà échantillonnés entre 2017 et 2019. Afin d'explorer la contribution des différents hôtes dans la dynamique et la répartition de cette tique, des collectes seront également réalisées sur différentes espèces de la faune sauvage, dont des oiseaux et des petits mammifères susceptibles de porter des stades immatures. Compte tenu des difficultés que pourraient poser leur identification, il est important de disposer de méthodes complémentaires à l'identification morphologique, rapides et standardisées, pour résoudre les problèmes taxonomiques tels que l'identification des stades immatures. Avec la démocratisation et la baisse des coûts des outils moléculaires, il serait intéressant de pouvoir développer une banque de données barcode avec le gène COI pour les adultes des espèces de *Hyalomma* potentiellement présentes dans le bassin méditerranéen, puis de pouvoir valider l'utilisation de ce gène dans l'identification de ces espèces en évaluant les niveaux de divergence génétique intra- et inter-spécifique, notamment au sein des complexes d'espèce cryptiques. Enfin il faudra tester l'utilité de cet outil pour l'identification en grand nombre des stades immatures collectés sur faune sauvage.

D'un point de vue taxonomique, l'un des groupes les plus complexes est le complexe d'espèces *H. marginatum*. Auparavant, on considérait que celui-ci était constitué d'une seule espèce extrêmement polymorphe, *H. marginatum* Koch, 1844, dont la distribution globale coïncide presque avec celle du genre entier, qui est présent de l'Europe du Sud, au Moyen-Orient, en Asie Centrale, du Sud, du Sud-Est ainsi qu'en l'Afrique. *Hyalomma isaaci* Sharif, 1928, *H. rufipes* Koch, 1844 et *H. turanicum* Pomerantzev, 1946 étaient considérées comme des sous-espèces de *H. marginatum* Koch, 1844. Après une révision morphologique approfondie, (Apanaskevich and Horak 2008) ont reconnu *H. isaaci*, *H. rufipes* et *H. turanicum* comme des espèces à part entière. De plus, (Apanaskevich and Horak 2006) ont également rétabli *H. glabrum* Delpy, 1949 qui était alors considéré comme un synonyme de *H. isaaci*. En région Paléarctique, l'ancien groupe de sous-espèces inclus dans *H. marginatum* est maintenant considéré comme étant formé par trois espèces, à savoir *H. marginatum*, *H. rufipes* Koch, 1844 et *H. turanicum* Pomerantzev 1946. *Hyalomma turanicum* pourrait être présent en Israël, au Liban et en Turquie, mais on le trouve principalement en Afrique sub-saharienne (Estrada-Peña et al. 2017). Apanaskevich et Horak (Apanaskevich and Horak 2008) n'ont pas été en mesure de confirmer sa présence à Chypre, en Libye et en Tunisie, et les spécimens précédemment identifiés là-bas comme *H. marginatum turanicum* seraient en fait des *H. marginatum*. Plus récemment, une étude de l'histoire évolutive des tiques du genre *Hyalomma*, basée sur une approche combinée associant à la fois des données morphologiques et moléculaires avec des séquences de gènes mitochondriaux et nucléaires a montré que *H. rufipes* pouvait être considérée comme une espèce séparée de *H. marginatum* et *H. turanicum* (Sands et al. 2017). Cependant de faibles niveaux de différenciation génétique, similaires aux divergences intraspécifiques ont été observés dans cette même étude pour le gène COI, entre *H. marginatum* et *H. turanicum*. Bien que ces deux espèces présentent des caractères morphologiques distincts (Apanaskevich and Horak 2008), un individu identifié comme *H. turanicum* du Pakistan se rapprochait plus dans l'arbre phylogénétique de *H. marginatum* (du Portugal et de la Russie) que de ses congénères d'Irak. Tout ceci suggère que la divergence entre les deux lignées est très récente, la non-monophilie de *H. turanicum* pouvant être attribuée soit à un tri incomplet des lignées entre les deux espèces ou alternativement à une introgression récente entre ces deux espèces. C'est pourquoi il pourrait être intéressant d'entreprendre des recherches plus approfondies sur le statut taxonomique de *H. marginatum* et de *H. turanicum*. Afin de pouvoir répondre à cette question, il faudra notamment veiller à disposer d'un échantillonnage approprié qui devra inclure un échantillonnage géographique suffisant dans l'aire de répartition des deux taxons. Un mauvais échantillonnage peut en effet entraîner des déductions

erronées sur la variation génétique, la démographie et les relations phylogénétiques (Gratton et al. 2015, de la Harpe et al. 2017).

La spéciation est un processus complexe par lequel une population ancestrale évolue en deux ou plusieurs taxons distincts. Elle est généralement décrite comme un continuum englobant tous les stades de divergence, des populations panmictiques aux espèces irréversiblement isolées (Seehausen et al. 2014). Le stade de ce continuum auquel deux populations sont suffisamment divergentes pour être appelées espèces est souvent sujet à débat et controverse. Au sein de ce continuum, il est nécessaire d'évaluer la variation génétique intraspécifique à plusieurs moments du processus de spéciation pour bien le comprendre (Radwan and Babik 2012, Seehausen et al. 2014). La disponibilité croissante du séquençage de nouvelle génération (cf encadré 1) facilite la combinaison de techniques qui comblent le fossé entre les échelles macro- et micro-évolutives et l'utilisation d'outils génomiques pour étudier la diversité intraspécifique pourrait révéler une diversité cryptique dans des lignées pour lesquelles la morphologie seule ne permet pas de prédire l'existence d'unités taxonomiques distinctes. Ces approches ont été utilisées avec succès dans le domaine de la conservation (p. ex. (Reyes-Velasco et al. 2018)) mais aussi dans le domaine des maladies à transmission vectorielle pour lesquelles une systématique précise des vecteurs est essentielle pour mieux comprendre l'épidémiologie des maladies (p. ex. (Cruaud et al. 2021) ).

## 1.2. Origine des populations présentes en France et mécanismes évolutifs en jeu dans cette invasion biologique

D'un point de vue conceptuel, une invasion biologique peut se dérouler selon sur trois grands scénarios qui s'avèrent non-exclusifs et qui peuvent se combiner (Facon et al. 2006) : un changement des régimes de migration des espèces invasives, des changements environnementaux accroissant le nombre d'habitats favorables, et/ou une évolution post-colonisation résultant en une meilleure adaptation des espèces aux conditions environnementales des territoires nouvellement colonisés. La multiplication des suivis d'aires de distribution de tiques au cours des deux dernières décennies a permis d'observer des modifications d'aires de distribution de tiques, notamment chez les espèces d'intérêt majeur en santé humaine et/ou vétérinaire (voir pour revue (Leger et al. 2013)). La biologie des tiques dures et plus spécifiquement celle de *H. marginatum*, leur permettent de disposer d'un certain nombre d'atouts au cours des processus d'invasion.

Les tiques n'ont que de faibles capacités de dispersion par elles-mêmes (Falco and Fish 1991). Leur dispersion géographique dépend donc des mouvements de leurs hôtes et de la durée de la phase parasitaire (6 à 20 jours en moyenne). Pour que la dispersion par l'hôte soit un succès, la tique devra demeurer fixée durant le voyage, réussir sa métamorphose, et trouver à l'arrivée un hôte sur lequel se fixer. Les caractéristiques du cycle de vie de la tique influenceront donc les probabilités de succès de dispersion à plus ou moins longue distance. Une tique de type monoxène peut être transportée efficacement sur de très longues distances puisqu'elle effectue l'intégralité de sa phase parasitaire sur un seul et même hôte. C'est le cas également, dans une moindre mesure, pour une tique dixène comme *H. marginatum*. Les résultats de captures d'oiseaux migrateurs infestés par *H. marginatum* permettent déjà de proposer des hypothèses sur le transport des stades juvéniles depuis leurs aires d'origine (Estrada-Peña et al. 2021). Les chevaux sont connus pour être l'un des principaux hôtes domestiques de *H. marginatum*, mais peu d'informations sont aujourd'hui disponibles sur le rôle, en France, d'autres animaux d'élevage comme les bovins, mais aussi sur le rôle de la faune sauvage (sangliers, chevreuils) dans l'installation et la dispersion de cette tique.

En phase de vie libre (c'est-à-dire 'hors-hôte'), les tiques sont très sensibles aux conditions environnementales. Cette vulnérabilité détermine d'ailleurs les gammes de températures et d'humidité caractérisant leur aire de distribution maximale. Plusieurs études de modélisation ont été menées au niveau européen pour expliquer et prédire la distribution de *H. marginatum* et ces études

ont mis l'accent sur l'adéquation entre des températures élevées, mais des précipitations et une humidité relative faibles (Estrada-peña and Venzal 2007, Estrada-Pena et al. 2011, Estrada-Pena et al. 2012). Des études de survie des tiques en enceintes climatiques et sur le terrain, réalisés dans notre unité (F. Stachurski, communication personnelle) ont montré que *H. marginatum* résistait bien aux faibles températures qui ne bloquent pas complètement son développement. Les femelles gorgées peuvent survivre sans pondre et pondent dès qu'elles sont remises à température d'élevage normale. Sur le terrain, une diapause comportementale semble inhiber l'activité des adultes de l'année qui bien que présents dans le milieu, n'infestent pas les chevaux. Les adultes à jeun constituent donc le seul stade de développement passant efficacement l'hiver. Les fortes capacités reproductives des tiques représentent également des atouts importants dans un contexte d'invasion : leurs pontes comportent de 2 000 à 20 000 œufs. Dès lors, l'établissement d'une nouvelle population semble un défi plus facilement réalisable quand les individus dispersés sont des femelles.

Dans le cadre d'invasions biologiques impliquant des phénomènes évolutifs, la taille et la structure des génomes de tiques constituent des atouts importants. Ces génomes, dont la taille varie de  $1.04 \times 10^9$  à  $7.1 \times 10^9$  paires de bases, sont constitués à 70 % de séquences répétées (Nene 2009). La taille du génome de *H. marginatum* serait de  $2.4 \times 10^9$  paires de bases (soit approximativement la taille du génome humain). Longtemps considéré comme inutile, il est maintenant avéré que la répétition de séquences (y compris non-codantes) constitue une source directe de diversité biologique clef dans l'évolution des espèces (Grechko 2011). Cette structure génomique augmente la probabilité d'apparition de nouvelles mutations sur l'une ou l'autre des copies de gènes ou de régions régulatrices par un mécanisme de relâchement de la contre-sélection de mutations. Certaines de ces mutations seront aptes à modifier le métabolisme et/ou les traits d'histoire de vie des tiques dans le sens d'une meilleure adaptation aux habitats nouvellement colonisés.

Nous allons donc chercher au cours de ce travail à i) émettre des hypothèses sur l'origine des populations de *H. marginatum* présentes sur le territoire français, ii) documenter l'installation et l'expansion en cours en Occitanie, et iii) étudier les facteurs environnementaux et évolutifs favorisant ces processus.

### 1.2.1. Inférer l'origine des populations présentes en Occitanie et leur structuration génétique actuelle

Une étude combinant des approches de phylogéographie et de génétique des populations incluant des individus échantillonnés en Occitanie ainsi que des individus d'autres populations du pourtour méditerranéen sera menée afin de comprendre les facteurs favorisant l'expansion géographique de cette espèce et d'émettre des hypothèses sur l'origine des populations de *H. marginatum* présentes sur le territoire français. Une des hypothèses à considérer est une origine des populations de tiques au Maghreb, hypothèse en cohérence avec les principales voies de migration des oiseaux, potentiellement porteurs de stades immatures, vers l'Europe (Estrada-Peña et al. 2021). Cette analyse sera basée sur le polymorphisme de plusieurs gènes mitochondriaux, combinés à du génotypage d'un large panel de marqueurs SNP (Single Nucleotide Polymorphism) (cf encadré 1). Cette étude permettra également de caractériser la structure génétique de ces populations en expansion.

Notre première hypothèse serait d'observer un patron génétique caractéristique des expansions géographiques avec une faible diversité génétique dans le nouvel environnement et une différenciation génétique significative entre les populations natives et celles nouvellement installées, résultant d'évènements de goulot d'étranglement suivis des effets de la dérive génétique suite à l'introduction. Alternativement, cette perte de diversité pourrait être atténuée par une connectivité accrue avec d'autres populations de la région avec des flux de gènes élevés permettant de maintenir des tailles efficaces de populations plus importantes.

La structure génétique sera également analysée en fonction des préférences d'hôtes de *H. marginatum* et ainsi que des données sur les mouvements de ces hôtes. Ce travail permettra à terme d'évaluer la probabilité d'introduction du virus CCHF en France continentale via les tiques dans un contexte de changement climatique et de mondialisation des échanges.

Les analyses des données feront appel à des approches classiques de génétique des populations afin d'explorer les caractéristiques des populations de *H. marginatum* : les tailles des populations, le mode et l'intensité de dispersion, la structuration des populations. L'exploration et la reconstruction des routes d'invasion (Estoup and Guillemaud 2010) sera à la fois basée sur la reconstruction de dendrogrammes basés sur les distances génétiques ainsi que des méthodes de clustering génétique qui pourront fournir des informations sur les populations source. Des approches comme la méthode « Approximate Bayesian Computation » ABC (Beaumont et al. 2002) permettant de tester différents scénarios d'invasion ou encore à l'aide des statistiques F développées par Patterson qui mesurent les corrélations de fréquences alléliques entre les populations et sont ainsi utiles pour comprendre les relations, mesurer et dater le brassage génétique (« genetic admixture ») entre populations (Patterson et al. 2012).

### 1.2.2. Obtenir un aperçu des mécanismes évolutifs en jeu dans cette invasion biologique

L'invasion en cours de *H. marginatum* questionne sur ses capacités à exploiter son nouvel environnement. Une première hypothèse est que les conditions environnementales du milieu méditerranéen français deviennent de plus en plus favorables pour son installation. Alternativement, il est également possible que des processus évolutifs permettent l'adaptation au nouveau milieu.

Afin d'explorer la première hypothèse, il est prévu d'étudier à l'aide de cages expérimentales le devenir des tiques *H. marginatum* sur le terrain et d'identifier les conditions environnementales (végétation, conditions climatiques) de survie et de développement des tiques sur deux sites représentant deux environnements contrastés. Ensuite un design de génétique quantitative sera mis en place au laboratoire afin de tester l'existence d'adaptation locale sur les traits d'histoire de vie et d'estimer le potentiel évolutif de ces traits.

Pour aller plus loin, on recherchera sur les données génomiques précédemment générées des signatures génomiques de l'adaptation des tiques à leur nouvel environnement. Plus précisément, il s'agira de scanner les données génomiques à la recherche de variants spécifiquement associés aux populations de l'aire nouvellement occupée par contraste avec les populations de l'aire d'origine.

*Ces aspects seront développés en étroite avec Hélène Jourdan, chercheuse à l'UMR ASTRE et spécialiste en écologie évolutive et Hélène Verheyden (UR Comportement et Ecologie de la Faune Sauvage, INRAE) et spécialiste de l'écologie alimentaire des grands ongulés sauvages dans le cadre du co-encadrement d'un étudiant en thèse.*

*Ce travail est financé dans le cadre du projet Défis clés Occitanie « Risques infectieux et vecteurs – Occitanie » (RIVOC), et porté par Thomas Pollet chercheur INRAE à l'UMR ASTRE. Le projet Holis-Tiques constitue un des trois projets prédéfinis emblématiques, multipartenaires et interdisciplinaires financé par RIVOC ayant pour objectif d'étudier la capacité d'adaptation des vecteurs. Les partenaires de ce projet sont localisés en région Occitanie (UR CEFS INRAE, Ecole nationale vétérinaire de Toulouse, Fédération Régionale des Chasseurs en Occitanie, Genotoul, Toulouse, Laboratoires vétérinaires départementaux en Occitanie) mais aussi au niveau national (UMR BIPAR, Maisons-Alfort ; UMR BIOEPAR, Nantes). Une étudiante en Master 2 sera financée dans le cadre de ce projet et débutera son stage en janvier 2022. Une demie bourse de thèse financée par la région Occitanie a également été acquise dans le cadre de ce projet. La demande de demie bourse complémentaire a été faite auprès du Cirad. Cette thèse débiterait en septembre 2022.*

Ces activités s'inscrivent également dans le cadre de la convention entre le Cirad et le Ministère de l'Agriculture (convention DGAL) 2021 qui couvre les activités d'expertise acarologique sur *Hyalomma marginatum* et notamment l'étude de l'origine géographique et structuration des populations de *H. marginatum* et la détermination des conditions environnementales de survie et de développement de *H. marginatum*, ainsi que le rôle de la faune sauvage.

#### **Encadré 1 : quels marqueurs pour comprendre l'introduction et l'extension de l'aire de répartition de *H. marginatum* ?**

Le **séquençage l'ADN mitochondrial** est utilisé depuis de nombreuses années dans les études phylogéographiques et phylogénétiques (Zhang and Hewitt 2003), principalement en raison de la facilité de découvrir et de détecter le polymorphisme dans les génomes des organelles. Ces génomes offrent à la fois des régions conservées permettant le design d'amorces PCR et des régions variables à utiliser comme marqueurs. Ils sont donc encore largement utilisés dans les études biogéographiques et le codage à barres de l'ADN. En raison des grandes difficultés à développer des marqueurs nucléaires chez les tiques, les marqueurs mitochondriaux ont et sont encore très largement utilisés pour étudier leur génétique des populations (Araya-Anchetta et al. 2015). Cependant, l'ADNmt ne représente qu'un seul locus et ne permet donc que d'observer une petite partie de l'histoire évolutive. Leur héritabilité maternelle ne fournit des informations que sur la biologie de dispersion des lignées maternelles. L'inférence que nous faisons sur l'histoire des espèces/populations est susceptible d'être fortement biaisée. Deuxièmement, la taille efficace de la population de l'ADNmt ne représente qu'un quart de celle des séquences autosomiques nucléaires, et les lignées d'ADNmt ont donc un taux de tri des lignées beaucoup plus rapide et un taux d'extinction des allèles plus élevé. Les conséquences de ce phénomène sont les suivantes : (i) les relations évolutives pourraient être trop simplifiées par les données de l'ADNmt ; (ii) la diversité génétique peut être sous-estimée par les marqueurs de l'ADNmt ; (iii) l'incertitude de l'analyse généalogique peut augmenter en raison de la probabilité accrue d'un plus grand nombre de liens manquants dans les haplotypes mitochondriaux. Un autre problème potentiel des données relatives à l'ADNmt est la possibilité d'amplifier des pseudogènes mitochondriaux dans les génomes nucléaires. C'est pourquoi il est intéressant de les utiliser en combinaison avec des marqueurs nucléaires.

Les **marqueurs microsatellites** sont utilisés pour les études de la diversité et de la différenciation génétique des populations depuis le début des années 1990 (Jarne and Lagoda 1996). Les régions de séquences flanquant les microsatellites sont souvent suffisamment conservées pour concevoir des amorces PCR qui sont fonctionnelles entre espèces apparentées et parfois même entre genres (Schlötterer and Wiehe 1999, Barbara et al. 2007). Ces séquences répétitives simples sont largement présentes chez les organismes eucaryotes, présentent des niveaux élevés de polymorphisme, obéissent à l'héritabilité mendélienne et suivent des modes d'évolution apparemment simples. Leur introduction dans les études de génétique des populations a considérablement amélioré la capacité à détecter la structure génétique des populations, à tester la filiation et la parenté, à évaluer la diversité génétique et à étudier l'histoire récente des populations. Ces marqueurs ont été développés pour un certain nombre d'espèces de tiques (Araya-Anchetta et al. 2015). Cependant le plus gros problème des marqueurs microsatellites est la présence d'allèles nuls, notamment chez les tiques (voir par ex. (Kempf et al. 2011, Dietrich et al. 2014, Huber et al. 2019)) qui conduisent à interpréter comme homozygote des individus hétérozygotes, ce qui conduit à une sous-estimation de la variabilité génétique et affecte le calcul du  $F_{ST}$  (Jarne and Lagoda 1996, Chapuis and Estoup 2007). Des marqueurs microsatellites ont récemment été développés chez *H. marginatum* (Hekimoglu et al. 2019) mais les auteurs n'ont réussi qu'à développer que cinq marqueurs dont deux présentent des biais. Les problèmes de développement semblent similaires à ceux rencontrés pour le développement de microsatellites chez *A. variegatum* (Huber et al. 2019). C'est pourquoi nous n'allons pas retenir ce type de marqueurs en priorité.

Les **approches de génotypage par séquençage** basées sur des technologies de séquençage de deuxième génération ou plus récentes ont gagné en popularité au cours des dernières années (voir par ex. review (Andrews et al. 2016)). Elles constituent une gamme de techniques proches qui s'appuient sur les enzymes de restriction pour déterminer les loci à séquencer. On peut citer parmi ces approches la « Restriction-site Associated DNA sequencing » (RAD-seq) (Baird et al. 2008), le « génotypage par séquençage » (GBS) (Elshire et al. 2011) ou encore le « séquençage RAD à double digestion » (ddRADseq) (Peterson et al. 2012). Toutes ces approches ont pour principe de réduire la complexité du génome par digestion avec des enzymes de restriction, suivie de différentes étapes de sélection de la taille des fragments d'ADN puis de l'ajout d'adaptateurs pouvant contenir des codes à barres, qui sont utilisés pour identifier les échantillons individuels qui sont multiplexés dans une seule bibliothèque. Ces techniques ciblent un sous-ensemble du génome, ce qui présente des avantages par rapport au séquençage du génome entier, comme une plus grande profondeur de couverture par locus (et donc un génotypage plus fiable) et permettent le séquençage d'un plus grand nombre d'échantillons pour un budget donné. En outre, contrairement à de nombreuses autres méthodes de production de données pangénomiques, elles ne nécessitent aucune information génomique préalable sur les taxons étudiés. Les loci peuvent se trouver dans toutes les zones du génome (c'est-à-dire dans les régions codantes et non codantes), et les individus au sein d'une même espèce ou entre espèces étroitement apparentées partagent généralement la plupart des loci en raison de la conservation des sites de restriction, ce qui en fait des outils de choix en écologie et génétique évolutive. En utilisant la technique de génotypage par séquençage (GBS) et en l'absence de génome de référence, la dispersion de tiques par les oiseaux marins a ainsi pu être étudiée avec succès (Moon et al. 2018, Moon et al. 2019, Moon et al. 2020).

## 2. Perspectives de recherche sur les moucheron du genre *Culicoides*

### 2.1. Circulation de *Culicoides imicola* au sein des territoires insulaires du sud-ouest de l'Océan Indien

Dans les îles du sud-ouest de l'Océan Indien (SOOI), les études qui ont porté sur les *Culicoides* et les agents infectieux associés, restent à ce jour limitées. Les principaux problèmes vétérinaires sont causés par les virus de la fièvre catarrhale ovine (bluetongue virus, BTV) et de la maladie hémorragique épizootique (epizootic hemorrhagic disease virus, EHDV), deux orbivirus transmis par des moucheron hématophages du genre *Culicoides*. Ces deux maladies dont les manifestations cliniques sont localement regroupées sous le terme de « bavite » causent des pertes économiques et sont responsables de la dégradation de l'état sanitaire du cheptel bovin. Si les situations épidémiologiques pour ces maladies sont bien décrites à l'île de la Réunion et à l'île Maurice (Jori et al. 2011, Sailleau et al. 2012, Cêtre-Sossah et al. 2014, Desvars et al. 2015), la situation sanitaire pour les autres territoires de la zone est largement méconnue.

De même, il n'existe que peu d'inventaires faunistiques pour les *Culicoides* et tous mettent en évidence une faible diversité spécifique allant de quelques espèces observées (deux à Maurice (Jori et al. 2011), trois aux Seychelles (Wirth and Messersmith 1977, Wirth 1990), cinq à la Réunion (Desvars et al. 2015, Grimaud et al. 2019)) à moins d'une vingtaine à Mayotte (Garros et al. 2019) et à Madagascar (Augot et al. 2013), ce qui contraste fortement avec d'autres régions du monde. En France par exemple, ce sont près d'une centaine d'espèces qui ont été recensées (Venail et al. 2012). Cette faible diversité spécifique peut s'expliquer par l'insularité des territoires et les grandes distances géographiques entre ces îles et le continent africain. Par exemple, Mayotte est située à 285 km de Madagascar et 485 km de l'Afrique continentale et l'île de La Réunion à 684 km de Madagascar et à 1680 km des côtes africaines.

*Culicoides imicola* est l'espèce la plus abondante et vectrice majeure de BTV et AHSV en région Afrotropicale. Elle est présente sur au moins quatre territoires de la région du Sud-Ouest de l'Océan Indien (Madagascar, La Réunion, l'île Maurice et Mayotte) (Jori et al. 2011, Desvars et al. 2015, Augot et al. 2017, Garros et al. 2019) bien que peu abondante à Mayotte (Garros et al. 2019). A La Réunion, il a été montré que *C. imicola* est abondant et dominant à basse altitude et peut être localement très abondant notamment sur la côte sud-ouest de l'île (Desvars et al. 2015, Grimaud et al. 2019). L'île a fait face au cours des vingt dernières années à des flambées épidémiques successives de différents sérotypes de fièvre catarrhale ovine et de la maladie hémorragique épizootique des cervidés mettant en évidence la diversité des orbivirus circulant dans l'île et peut-être dans toute la région. En 2011 et en 2013, la détection d'EHDV-1 et d'EHDV-7, alors qu'un arrêté préfectoral de 2008 interdisant l'importation de ruminants vivants était en cours, questionne sur le mode d'introduction de ces sérotypes. Si la découverte de ces nouveaux sérotypes sur l'île peut résulter d'une absence de détection avant ces dates ou de son émergence depuis un cycle sauvage avec les cerfs Rusa, la question de leur introduction via des *Culicoides* infectés transportés par les vents se pose. La proximité géographique entre l'île Maurice et La Réunion permettrait le passage d'une île à l'autre via des phénomènes de dispersion passive par les vents. Ceci pourrait également s'appliquer à l'ensemble des îles du Sud-Ouest de l'Océan Indien bien que les distances géographiques beaucoup plus grandes entre ces territoires insulaires tendraient à réduire les probabilités de transport et d'introduction.

C'est pourquoi, en miroir des travaux de phylogéographie et de génétique des populations de *C. imicola* réalisés dans le bassin méditerranéen et en Afrique, la structuration de *C. imicola* dans la région du sud-ouest de l'océan Indien incluant les territoires du continent africain pourra être étudiée à l'aide de marqueurs microsatellites et de séquences mitochondriales. La région du SOOI caractérisée par ses territoires insulaires éloignés pour certains par de grandes distances peut signer des structurations génétiques marquées pour un moucheron à la faible dispersion active. On peut aussi

attendre des paramètres démographiques stables (pas ou peu de phénomène d'expansion), et une proximité génétique avec les populations du sud-est africain. On s'interrogera également sur l'influence des vents dominants dans la structuration observée. La structuration génétique permettra de mettre en évidence si les territoires sont connectés génétiquement. Connaissant la situation épidémiologique pour la fièvre catarrhale ovine et la maladie hémorragique épizootique des cervidés pour les différents territoires, la distance géographique, les mouvements du vent et les échanges d'animaux connus, cette analyse permettra de définir un niveau de risque de circulation de nouveaux sérotypes ou d'installation de nouvelles espèces de *Culicoides*.

*Ce travail sera réalisé en collaboration avec Claire Garros et Marlène Dupraz, chercheuses entomologistes à l'UMR ASTRE dans le cadre d'un co-encadrement de thèse dont le financement sera demandé dans le cadre du prochain Projet interrégional de coopération territoriale européenne (Programme INTERREG, FEDER) et qui démarrerait en 2023.*

## 2.2. Influence de l'écologie et des préférences d'hôte sur la structuration génétique, exemple de *Culicoides chiopterus*

Nous avons vu précédemment que la dispersion des *Culicoides* était influencée par différents facteurs environnementaux. Cependant, l'influence de ces différents facteurs est modulée en fonction des espèces de *Culicoides* considérées, celles-ci présentant des préférences d'hôte et d'écologie larvaire différentes. Les travaux de thèse d'Antoine Mignotte ont porté sur *C. obsoletus*, une espèce très largement répandue, capable de se reproduire dans une large gamme d'habitats. Il a montré que les populations de cette espèce présentaient une très faible structuration y compris à large échelle et que cette espèce se dispersait fortement. Il serait donc intéressant de comparer ces résultats avec ceux d'une autre espèce, *C. chiopterus* qui est une espèce spécialiste qui semble fortement associée aux bovins aux stades immature et adulte. Nous faisons l'hypothèse que ces différences auront une influence significative sur leur comportement de dispersion. Un jeu de marqueurs microsatellites a déjà été développé pour cette espèce et les échantillons de *Culicoides* sont déjà disponibles à l'échelle française entre départements mais aussi à l'échelle locale, entre fermes à l'échelle de quelques kilomètres.

## 2.3. A l'Est rien de nouveau ?

Enfin, les travaux de thèse réalisés à la fois sur *C. imicola* et sur *C. obsoletus* ont montré que certaines questions restaient en suspens par manque d'échantillons dans la partie orientale de la zone d'étude. Notamment, il serait très intéressant d'inclure dans une future étude des échantillons de *C. imicola* provenant d'Extrême-Orient pour étudier les relations génétiques entre les populations orientales, les populations africaines et celles de l'est de la Méditerranée. Une étude récente de la variation de la séquence COI de *C. imicola* a inclus des spécimens de l'Inde et de la Chine. Elle a montré que les populations d'Extrême-Orient partageaient des haplotypes communs avec des populations d'Afrique du Sud et d'Israël (Harrup, communication personnelle), soutenant ainsi l'hypothèse d'une connectivité génétique entre ces zones. Il est intéressant de noter que cette connectivité a également été étayée par l'examen de la variation des sérotypes de FCO (Maan et al. 2004, Nomikou et al. 2009).

De même, pour *C. obsoletus*, si nous avons pu proposer une histoire pour la région ouest nous n'avons pas encore une vision complète de l'histoire globale. Bien que le centre de distribution de *C. obsoletus* semble être en Europe, cette espèce est également présente dans de nombreux pays de l'hémisphère nord, notamment en Amérique et en Asie. Nous nous sommes donc interrogés sur le scénario évolutif ayant permis cette large répartition géographique. Nous avons émis l'hypothèse, que le passage du continent asiatique au continent américain aurait pu se faire durant les derniers épisodes de glaciations du Pléistocène par le détroit de Béring (Figure 21). C'est pourquoi il serait intéressant de

pouvoir conduire une étude incluant des individus provenant de l'ensemble de l'aire de répartition de *C. obsoletus*.

Cependant, ce type d'étude va nécessiter l'obtention d'échantillons en provenance de nouvelles zones géographiques et donc le développement de nouveaux partenariats, elles ne pourront donc pas être réalisées à court terme.

## Conclusion générale

---

Connaître la biologie et l'écologie d'une espèce vectrice est capital pour anticiper et limiter la dispersion de pathogènes. L'ensemble des travaux que j'ai menés, encadrés et ceux auxquels j'ai pu collaborer ont apporté je l'espère, un certain nombre de connaissances nouvelles. Tout d'abord, sur les « forces en présence » par la caractérisation et la cartographie des espèces d'intérêt et l'étude de leur diversité cryptique par des approches de taxonomie moléculaire. Je me suis aussi très largement intéressée à la structure génétique, aux capacités de dispersion et à l'influence d'un certain nombre de facteurs extrinsèques comme la connectivité paysagère, le vent ou encore les activités humaines sur la dispersion de ces espèces. J'ai également touché à l'histoire évolutive de certaines de ces espèces car bien souvent, étudier le passé a été nécessaire pour mieux comprendre le présent. Je souhaite que ces résultats puissent contribuer à anticiper les risques d'émergence mais aussi à définir des stratégies de lutte anti-vectorielle adéquates et efficaces. Toutefois, les résultats obtenus soulèvent encore de nombreuses autres questions notamment sur les mécanismes adaptatifs à l'origine du succès invasif des populations de ces espèces ainsi que sur les changements d'aire de répartition des espèces vectrices dans un contexte de changement global. Pour terminer, je tenais ici à remercier chaleureusement tous les collègues avec qui j'ai eu le plaisir et la joie de travailler au cours de ces 25 dernières années. Plus particulièrement, un grand merci aux étudiants et doctorants que j'ai pu encadrer et dont j'ai pu apprécier la motivation, l'enthousiasme et la bonne humeur et sans qui, ces travaux n'auraient pas pu être réalisés.

## Choix de publications jointes au document

---

1. **Huber, K.**, Ba, Y., Dia, I., Mathiot, C., Sall, A.A., Diallo, M., 2008. *Aedes aegypti* in Senegal: genetic diversity and genetic structure of domestic and sylvatic populations. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 79, 218-229.
2. Stachurski, F., Tortosa, P., Rahajarison, P., Jacquet, S., Yssouf, A., **Huber, K.**, 2013. New data regarding distribution of cattle ticks in the south-western Indian Ocean Islands. *Veterinary Research* 44, 79.
3. Jacquet, S., Garros, C., Lombaert, E., Walton, C., Restrepo, J., Allene, X., Baldet, T., Cetre-Sossah, C., Chaskopoulou, A., Delécolle, J. C., Desvars, A., Djerbal, M., Fall, M., Gardes, L., De Garine-Wichatitsky, M., Goffredo, M., Gottlieb, Y., Gueye Fall, A., Kasina, A., Labuschagne, K., Lhor, Y., Lucientes, J., Martin, T., Mathieu, B., Miranda, M. A., Pages, M., Pereida Da Fonseca, I., Ramilo, D. W., Segard, A., Setier-Rio, M. L., Stachurski, F., Tabbabi, A., Talla Seck, M., Venter, G., Zimba, M., Balenghien, T., Guis, H., Chevillon, C., Bouyer, J, **Huber, K.**, 2015. Colonization of the Mediterranean Basin by the vector biting midge species *Culicoides imicola*: an old story. *Molecular Ecology* 24, 5707–5725.
4. Jacquet, S., **Huber, K.**, Pagès, N., Talavera, S., Burgin, L. E., Carpenter, S., Sanders, C., Dicko, A. H., Djerbal, M., Lhor, Y., Lucientes, J., Miranda, M. A., Pereira Da Fonseca, I., Ramilo, D. W., Setier-Rio, M. L., Bouyer, J., Chevillon, C., Balenghien, T., Guis, H., Garros, C. 2016. Range expansion of the Bluetongue vector, *Culicoides imicola*, in continental France likely due to rare wind-transport events. *Scientific Reports* 6, 27247
5. **Huber, K.**, Jacquet, S., Rivallan, R., Adakal, H., Vachier, N., Risterucci, A.M., Chevillon, C., 2019. Low effective population sizes in *Amblyomma variegatum*, the tropical bont tick. *Ticks and Tick-Borne Diseases* 10, 93-99.
6. Mignotte, A., Garros, C., Gardès, L., Balenghien, T., Duhayon, M., Rakotoarivony, I., Tabourin, L., Poujol, L., Mathieu, B., Ibañez-Justicia, A., Deniz, A., Cvetkovikj, A., Purse, B.V., Ramilo, D.W., Stougiou, D., Werner, D., Pudar, D., Petrić, D., Veronesi, E., Jacobs, F., Kampen, H., Pereira da Fonseca, I., Lucientes, J., Navarro, J., de la Puente, J.M., Stefanovska, J., Searle, K.R., Khallaayoune, K., Culverwell, C.L., Larska, M., Bourquia, M., Goffredo, M., Bisia, M., England, M., Robin, M., Quaglia, M., Miranda-Chueca, M.Á., Bødker, R., Estrada-Peña, R., Carpenter, S., Tchakarova, S., Boutsini, S., Sviland, S., Schäfer, S.M., Ozoliņa, Z., Segliņa, Z., Vatansever, Z., **Huber, K.**, 2020. The tree that hides the forest: cryptic diversity and phylogenetic relationships in the Palaearctic vector *Obsoletus/Scoticus* Complex (Diptera: Ceratopogonidae) at the European level. *Parasites & Vectors* 13, 265.

## *Aedes aegypti* in Senegal: Genetic Diversity and Genetic Structure of Domestic and Sylvatic Populations

Karine Huber, Yamar Ba, Ibrahima Dia, Christian Mathiot, Amadou A. Sall, and Mawlouth Diallo\*

Institut Pasteur de Dakar, Dakar, Senegal

**Abstract.** *Aedes aegypti* is the main vector of dengue viruses. The epidemiology of dengue fever remains poorly understood in Senegal. A sylvatic transmission seems to predominate. However, despite the sylvatic circulation of the dengue virus and the presence of vectors in urban areas, only sporadic cases have been reported. *Ae. aegypti* is a polytypic species. In Senegal, a purely sylvatic form is found in the forest gallery areas and a domestic form is found in the villages in savannah and sahelian areas and in urban areas. Using allozymes, we analyzed the genetic diversity and the genetic structure of *Ae. aegypti* populations differing in their ecological characteristics. Populations from Senegal were significantly structured but with a low level of genetic differentiation. *Ae. aegypti* from the “domestic” populations show a decreased genetic diversity and a lower genetic differentiation compared with “sylvatic” populations. These findings suggest that environmental conditions, ecological factors, and human activities may impact the genetic structure of *Ae. aegypti* populations in Senegal.

### INTRODUCTION

Dengue fever (DF) and dengue hemorrhagic fever (DHF) are tropical and sub-tropical, mosquito-borne diseases resulting from infection with one of the four antigenically distinct serotypes of dengue viruses (DENV) in the family *Flaviviridae*. DF/DHF is the most important arboviral disease of humans occurring in tropical countries of the world, where > 2.5 billion people are at risk of infection.<sup>1</sup> It is estimated that between 50 and 100 million new dengue infections occur annually,<sup>2</sup> and the average fatality rate for DHF ranges from 5% to 40%.<sup>3</sup>

The epidemiology of dengue fever is not well understood in West Africa. As in Asia, a sylvatic transmission cycle has been shown in this region.<sup>4,5</sup> However, unlike Southeast Asia where inter-human transmission is most commonly detected, in West Africa, the sylvatic transmission seems to be predominant. In Senegal, although DENV-1, -2, and -4 (never DENV-3) have been isolated incidentally from humans, only DENV-2 was repeatedly isolated from mosquitoes and humans and once from a monkey, mostly from the sylvatic focus in Kedougou area.<sup>6,7</sup> However, despite sylvatic manifestations and the presence of mosquito vectors in urban areas, only sporadic cases have been reported during or after these sylvatic viral amplifications, and DENV isolations from *Aedes aegypti* are rare.<sup>8,9</sup>

It was shown experimentally that the susceptibility and capacity of *Ae. aegypti* to transmit DENV are variable and depend on geographical origin of natural populations.<sup>10</sup> A difference in the sensitivity to infection has also been observed among *Ae. aegypti* females from the same progeny.<sup>11</sup> In fact, *Ae. aegypti*, the main mosquito vector of DENV, is a polytypic species that includes two main forms differing in their morphology, ecology, ethology, and genetics<sup>12,13</sup>: 1) *Ae. aegypti aegypti*, a light-colored form that breeds in domestic or peridomestic environments and occurs in the New World, Asia, and in the coastal areas of East Africa, and 2) *Ae. aegypti formosus*, a dark form that breeds in tree holes and sometimes in rock holes, and is mainly found in sub-Saharan Af-

rica. Only *Ae. aegypti aegypti* is associated with dengue epidemics in the Americas and Asia.

The lack of data on genetic variation of *Ae. aegypti* populations from West Africa limits conclusions about whether both forms exist there, although certain authors described the absence of *Ae. aegypti aegypti* in this part of the continent.<sup>14</sup> In Burkina Faso, the domestic/peridomestic nature of the aquatic breeding stages permitted the differentiation of two distinct morphological forms: a wild dark form and a clear domestic form.<sup>15</sup>

In Senegal, morphologic and ethologic variations were observed between *Ae. aegypti* populations, related to their geographical localization and type of habitat. A sylvatic form is found in the gallery forests near Kedougou (southern Senegal). This form is more abundant in the forest gallery than in the villages, has zoophilic tendencies, and uses tree holes as breeding sites. A domestic form is present in savannah villages, sahelian areas, and in urban areas. This later form is similar ecologically to *Ae. aegypti aegypti*. It colonizes artificial water containers, water storage containers (i.e., clay jars, metallic barrels), as well as abandoned containers (i.e., cans, plastic bottles, worn tires) and is highly anthropophilic. Morphologically, both forms found in Senegal are characterized by a dark color, the “domestic” form is slightly paler and always has pale scales present on the first abdominal tergite, whereas the sylvatic form does not (M. Diallo, unpublished data). In Senegal, data on the genetic status of the *Ae. aegypti* populations are scarce. Studies including populations from Senegal date back to 25 years ago and therefore need to be revised because of profound environment changes that may have affected *Ae. aegypti* populations there.

In this study, we analyzed the genetic diversity and structure of *Ae. aegypti* populations collected in five distinct areas of Senegal differing in their ecological characteristics: 1) sylvatic populations from the gallery forest area of Kedougou and 2) domestic populations from the savannah areas of Kounghoul, Kaffrine, and Diourbel and the sahelian area of Barkedji (Figure 1).

### MATERIALS AND METHODS

**Mosquito samples.** Twenty-five mosquito samples were collected from November 2002 to January 2003 (Table 1) in five

\* Address correspondence to Mawlouth Diallo, Institut Pasteur, 36 Avenue Pasteur, BP 220, Dakar, Senegal. E-mail: diallo@pasteur.sn



FIGURE 1. Map of Senegal showing the locations of *Ae. aegypti* samples collected from November 2002 to January 2003.

distinct areas of Senegal (Figure 1) differing in ecological characteristics: five samples were from the gallery forest area of Kedougou where a sylvatic cycle of dengue virus

transmission takes place, from the savannah areas of Kougheul (seven samples), Kaffrine (three samples), and Diourbel (five samples), and five from the sahelian area

TABLE 1  
Location of *Ae. aegypti* samples collected in Senegal from November 2002 to January 2003

| Sample | Location          | Commune     | Area     | Collection date | Breeding site   |
|--------|-------------------|-------------|----------|-----------------|-----------------|
| BAR1   | Barkedji          | Barkedji    | Barkedji | 11/28/02        | Metallic barrel |
| BAR2   | Barkedji          | Barkedji    | Barkedji | 11/28/02        | Metallic barrel |
| BAR3   | Gasse Wolof       | Barkedji    | Barkedji | 11/28/02        | Metallic barrel |
| BAR4   | Diagali           | Barkedji    | Barkedji | 11/28/02        | Clay jar        |
| BAR5   | Diagali           | Barkedji    | Barkedji | 11/28/02        | Metallic barrel |
| DIO1   | Gallo             | N'Goye      | Diourbel | 01/22/03        | Clay jar        |
| DIO2   | Gallo             | N'Goye      | Diourbel | 01/22/03        | Clay jar        |
| DIO3   | N'Dione           | N'Goye      | Diourbel | 01/22/03        | Clay jar        |
| DIO4   | N'Dione           | N'Goye      | Diourbel | 01/22/03        | Clay jar        |
| DIO5   | Khodabetch        | N'Goye      | Diourbel | 01/22/03        | Clay jar        |
| KAF1   | Thiale            | Kai         | Kaffrine | 01/22/03        | Clay jar        |
| KAF2   | N'Dougoubene      | Kai         | Kaffrine | 01/22/03        | Metallic barrel |
| KAF3   | Tun Cope          | Kai         | Kaffrine | 01/22/03        | Plastic barrel  |
| KOU1   | Darou Koung-Koung | Ribo Escale | Kougheul | 01/21/03        | Metallic barrel |
| KOU2   | Darou Koung-Koung | Ribo Escale | Kougheul | 01/21/03        | Clay jar        |
| KOU3   | Thiakhathie       | Ribo Escale | Kougheul | 01/21/03        | Metallic barrel |
| KOU4   | Thiakhathie       | Ribo Escale | Kougheul | 01/21/03        | Metallic barrel |
| KOU5   | Ribo Kodiote      | Ribo Escale | Kougheul | 01/21/03        | Metallic barrel |
| KOU6   | Ribo Kodiote      | Ribo Escale | Kougheul | 01/21/03        | Metallic barrel |
| KOU7   | Darou Wolof       | Kougheul    | Kougheul | 11/20/02        | Metallic barrel |
| KED1   | Fadiga            | Kedougou    | Kedougou | 11/24/02        | Tree hole       |
| KED2   | Fadiga            | Kedougou    | Kedougou | 11/24/02        | Tree hole       |
| KED3   | PK10              | Kedougou    | Kedougou | 11/23/02        | Tree hole       |
| KED4   | PK10              | Kedougou    | Kedougou | 11/23/02        | Tree hole       |
| KED5   | PK10              | Kedougou    | Kedougou | 11/23/02        | Tree hole       |

of Barkedji. Natural (tree holes) and peridomestic and domestic artificial breeding sites (water storage containers) were studied. Samples collected include eggs, larvae, and pupae, which were reared to the adult stage in an insectarium. Adults were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis for isoenzyme polymorphisms. A total of 1,086 mosquitoes were analyzed with an average of 43.4 mosquitoes per collection site.

**Isoenzyme polymorphism.** Individual mosquitoes were homogenized in 25  $\mu\text{L}$  distilled water. The homogenate was centrifuged (15,000g, 3 minutes at  $+4^{\circ}\text{C}$ ), and the supernatant was subjected to starch gel electrophoresis in Tris-maleate-EDTA (TME), pH 7.4, buffer. Ten isoenzymes loci were studied: phosphoglucosomerase (PGI), glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT1 and GOT2), glycerol-phosphate dehydrogenase (GPD), hexokinases (HK1, HK2, and HK3), malate dehydrogenase (MDH), malic enzyme (ME), and phosphoglucomutase (PGM). These techniques are described in detail by Paupy and others.<sup>16</sup> A strain developed from an isofemale lineage of *Ae. aegypti* "Paea" (Tahiti, French Polynesia) was used as a mobility control. For field-collected samples, alleles were numbered according to their mobility and compared with the most common allele obtained at each locus in the control strain.

**Genetic analysis.** POPGENE (v. 1.31)<sup>17</sup> was used to calculate allele frequencies, observed ( $H_o$ ) and expected ( $H_E$ ) heterozygosity, and effective number of alleles.

FSTAT (v. 2.9.3.2)<sup>18</sup> was used for testing the significance of differences in average values of  $H_E$  among the groups of populations (10,000 permutations, one-sided test or two-sided test of the null hypothesis of no difference).

Analysis of molecular variance (AMOVA)<sup>19</sup> was performed using ARLEQUIN (v. 3.0).<sup>20</sup> Four different grouping factors were tested: geography (location of samples), vegetation type, the subspecies, and type of breeding site. Total genetic variance was partitioned into the following hierarchical levels for each analysis: among groups, among populations within groups, and within populations. For each computation,  $\Phi$  statistics were calculated and tested for significance using 1,000 permutations.

Deviation from Hardy-Weinberg proportions, genotypic linkage disequilibrium, and genetic differentiation was tested using GENEPOP (v. 3.3) software.<sup>21</sup>  $F_{st}$  and  $F_{is}$  were estimated as described by Weir and Cockerham.<sup>22</sup> Heterozygote deficits were tested using an exact test procedure.<sup>23</sup> Global disequilibrium between pairs of loci was tested for each sample. Genotypic differentiation was tested by calculating the  $P$  value of an  $F_{st}$  estimate. The overall significance of multiple tests was estimated using the Fisher combined probability test. Isolation by distance was assessed by determining the significance of the correlation between  $F_{st}$  estimates and geographical distances.<sup>24,25</sup> The significance level of each test was adjusted, based on the number of tests run, according to the sequential method of Bonferroni.<sup>26</sup> Kruskal-Wallis tests were performed for mean comparisons using R software (version 2.0.1).<sup>27</sup> A genetic distance matrix based on pairwise  $F_{st}$ 's calculated with ARLEQUIN (v. 3.0)<sup>20</sup> was used to construct a tree among all collections using the neighbor-joining method in the NEIGHBOR procedure in PHYLIP (v. 3.6b).<sup>28</sup>

## RESULTS

**Genetic diversity.** All 10 isozyme loci analyzed were polymorphic, displaying a total of 39 alleles (Table 2, the raw data is available on request). All the populations from the savannah areas (Koungheul, Kaffrine, and Diourbel) and from the sahelian area of Barkedji harbored relatively few alleles (17–21; mean number of alleles per locus, 1.3–2.1). The largest number of alleles (27) was observed in the forest gallery area of Kedougou (KED4). The other populations of this area harbored at least 20 alleles (mean number of alleles per locus, 2.0–2.7).

To highlight populations with unusual allelic compositions, the presence of "private" alleles (occurring in a single population) were identified. There were four such private alleles: four were present in populations from Kedougou [KED4 (HK2 and PGI), KED2 (MDH), and KED3 (MDH)] and one in the savannah population KOU3 (MDH) from the Koungheul area. Some alleles were also specific to a region; one allele from ME was only present in populations from the Kedougou area, and one allele from PGI and one from PGM were present only in populations from the Barkedji area.

The population with the richest allelic composition (KED4, 27 alleles) had, when we excluded the 10 alleles that were automatically present because there were 10 loci, 58.6% [(27 – 10)/(39 – 10)] of the allelic diversity. All the populations from the Kedougou area combined yielded 89.7% of the total allelic diversity detected in this study.

When samples were grouped according to geographical location, expected heterozygosity was significantly higher ( $P = 0.019$ ) for the populations from the Kedougou area ( $H_E = 0.189$ ) than for those from the other areas ( $H_E = 0.160$ ). Among expected heterozygosity of these four other areas (Barkedji [ $H_E = 0.158$ ], Diourbel [ $H_E = 0.171$ ], Koungheul [ $H_E = 0.162$ ], Kaffrine [ $H_E = 0.154$ ]), no significant difference was detected ( $P = 0.85$ ).

**AMOVA analysis.** AMOVA results (Table 3) did not indicate any genetic structure associated with geographical location, ecological characteristics of the sampling area, the subspecies, or the type of breeding site. For all types of groupings, most of the genetic variation was found within populations ( $-90\%$ ) and among populations within groups ( $-5.5\%$ ) with significant  $P$  values ( $< 0.00001$ ). Genetic variation among groups is higher (3.56%) when samples are grouped according to subspecies than when they are grouped by geographical location (1.93%), vegetation type (2.64%), or type of breeding site (2.36%).

**Hardy-Weinberg equilibrium.** Of 124 tests run, only two significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were detected after application of Bonferroni procedures: GOT1/KED5 ( $F_{is} = +0.668$ ) and GPD/KED2 ( $F_{is} = +1$ ) (Table 2). Hardy-Weinberg equilibrium was also tested assuming that the alternative hypothesis, H1, was heterozygote deficit (H0: random mating). All deviations detected were caused by a heterozygote deficit. When considering global tests (i.e., all loci for each sample), two samples showed significant heterozygote deficit, KED4 and KED5, and one showed a heterozygote excess (BAR3). When samples were grouped according to their collection origin, significant heterozygote deficits were observed for the samples from Kedougou and Koungheul.

**Genetic differentiation.** The overall  $F_{st}$  value for all 25

TABLE 2

*F<sub>is</sub>* and deviations from Hardy-Weinberg proportions observed at 10 isoenzyme loci in 25 *Ae. aegypti* samples collected in Senegal 2002–2003

| Samples                | Locus |        |       |        |        |        |        |       |        |        | All loci |        |
|------------------------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|----------|--------|
|                        | HK1   | HK2    | HK3   | GOT1   | GOT2   | GPD    | MDH    | ME    | PGI    | PGM    |          |        |
| BAR1                   |       |        |       |        |        |        |        |       |        |        |          |        |
| <i>N</i>               | 48    | 47     | 48    | 48     | 48     | 48     | 48     | 48    | 48     | 48     | 48       |        |
| <i>na</i>              | 1     | 2      | 1     | 2      | 1      | 1      | 3      | 1     | 2      | 4      |          | 1.800  |
| <i>ne</i>              | 1.000 | 1.476  | 1.000 | 1.064  | 1.000  | 1.000  | 2.080  | 1.000 | 1.133  | 2.212  |          | 1.297  |
| <i>H<sub>obs</sub></i> | 0.000 | 0.362  | 0.000 | 0.063  | 0.000  | 0.000  | 0.625  | 0.000 | 0.125  | 0.542  |          | 0.172  |
| <i>H<sub>exp</sub></i> | 0.000 | 0.326  | 0.000 | 0.061  | 0.000  | 0.000  | 0.525  | 0.000 | 0.118  | 0.554  |          | 0.158  |
| <i>F<sub>is</sub></i>  | –     | –0.011 | –     | –0.022 | –      | –      | –0.193 | –     | –0.056 | +0.022 |          | –0.084 |
| <i>P</i>               | –     | 0.66   | –     | 1      | –      | –      | 0.05   | –     | 1      | 0.79   |          | 0.70   |
| BAR2                   |       |        |       |        |        |        |        |       |        |        |          |        |
| <i>N</i>               | 48    | 48     | 48    | 48     | 48     | 48     | 48     | 48    | 48     | 48     |          |        |
| <i>na</i>              | 1     | 2      | 1     | 2      | 1      | 1      | 3      | 1     | 2      | 5      |          | 1.900  |
| <i>ne</i>              | 1.000 | 1.021  | 1.000 | 1.064  | 1.000  | 1.000  | 2.589  | 1.000 | 1.087  | 2.027  |          | 1.279  |
| <i>H<sub>obs</sub></i> | 0.000 | 0.021  | 0.000 | 0.021  | 0.000  | 0.000  | 0.646  | 0.000 | 0.083  | 0.313  |          | 0.108  |
| <i>H<sub>exp</sub></i> | 0.000 | 0.021  | 0.000 | 0.061  | 0.000  | 0.000  | 0.620  | 0.000 | 0.081  | 0.512  |          | 0.130  |
| <i>F<sub>is</sub></i>  | –     | –      | –     | +0.662 | –      | –      | –0.042 | –     | –0.033 | +0.392 |          | +0.165 |
| <i>P</i>               | –     | –      | –     | 0.03   | –      | –      | 0.39   | –     | 1      | 0.00   |          | 0.01   |
| BAR3                   |       |        |       |        |        |        |        |       |        |        |          |        |
| <i>N</i>               | 47    | 45     | 47    | 48     | 48     | 48     | 48     | 48    | 48     | 47     |          |        |
| <i>na</i>              | 2     | 3      | 2     | 1      | 1      | 1      | 3      | 1     | 3      | 3      |          | 2.000  |
| <i>ne</i>              | 1.022 | 1.687  | 1.022 | 1.000  | 1.000  | 1.000  | 2.466  | 1.000 | 1.111  | 1.658  |          | 1.296  |
| <i>H<sub>obs</sub></i> | 0.021 | 0.511  | 0.021 | 0.000  | 0.000  | 0.000  | 0.771  | 0.000 | 0.104  | 0.447  |          | 0.188  |
| <i>H<sub>exp</sub></i> | 0.021 | 0.412  | 0.021 | 0.000  | 0.000  | 0.000  | 0.601  | 0.000 | 0.101  | 0.401  |          | 0.156  |
| <i>F<sub>is</sub></i>  | –     | –0.245 | –     | –      | –      | –      | –0.287 | –     | –0.031 | –0.115 |          | –0.207 |
| <i>P</i>               | –     | 0.22   | –     | –      | –      | –      | 0.01   | –     | 1      | 0.60   |          | 0.10   |
| BAR4                   |       |        |       |        |        |        |        |       |        |        |          |        |
| <i>N</i>               | 27    | 26     | 27    | 26     | 27     | 27     | 27     | 27    | 27     | 27     |          |        |
| <i>na</i>              | 1     | 2      | 1     | 3      | 1      | 1      | 3      | 1     | 1      | 3      |          | 1.700  |
| <i>ne</i>              | 1.000 | 1.551  | 1.000 | 1.517  | 1.000  | 1.000  | 1.926  | 1.000 | 1.000  | 2.101  |          | 1.310  |
| <i>H<sub>obs</sub></i> | 0.000 | 0.385  | 0.000 | 0.385  | 0.000  | 0.000  | 0.593  | 0.000 | 0.000  | 0.519  |          | 0.188  |
| <i>H<sub>exp</sub></i> | 0.000 | 0.362  | 0.000 | 0.348  | 0.000  | 0.000  | 0.490  | 0.000 | 0.000  | 0.534  |          | 0.173  |
| <i>F<sub>is</sub></i>  | –     | –0.064 | –     | –0.109 | –      | –      | –0.215 | –     | –      | +0.029 |          | –0.087 |
| <i>P</i>               | –     | 1      | –     | 0.13   | –      | –      | 0.82   | –     | –      | 0.03   |          | 0.17   |
| BAR5                   |       |        |       |        |        |        |        |       |        |        |          |        |
| <i>N</i>               | 20    | 20     | 20    | 20     | 20     | 20     | 20     | 20    | 20     | 20     |          |        |
| <i>na</i>              | 1     | 2      | 1     | 3      | 2      | 2      | 3      | 1     | 1      | 4      |          | 2.000  |
| <i>ne</i>              | 1.000 | 1.724  | 1.000 | 2.216  | 1.051  | 1.105  | 1.891  | 1.000 | 1.000  | 2.067  |          | 1.406  |
| <i>H<sub>obs</sub></i> | 0.000 | 0.600  | 0.000 | 0.600  | 0.050  | 0.100  | 0.550  | 0.000 | 0.000  | 0.450  |          | 0.235  |
| <i>H<sub>exp</sub></i> | 0.000 | 0.430  | 0.000 | 0.563  | 0.050  | 0.097  | 0.483  | 0.000 | 0.000  | 0.530  |          | 0.215  |
| <i>F<sub>is</sub></i>  | –     | –0.407 | –     | –0.068 | –      | –0.027 | –0.142 | –     | –      | +0.153 |          | –0.094 |
| <i>P</i>               | –     | 0.12   | –     | 0.07   | –      | 1      | 0.28   | –     | –      | 0.00   |          | 0.01   |
| DIO1                   |       |        |       |        |        |        |        |       |        |        |          |        |
| <i>N</i>               | 17    | –      | 1     | 17     | 17     | 17     | 16     | 17    | 17     | 17     |          |        |
| <i>na</i>              | 1     | –      | 1     | 1      | 1      | 1      | 3      | 1     | 1      | 2      |          | 1.333  |
| <i>ne</i>              | 1.000 | –      | 1.000 | 1.000  | 1.000  | 1.000  | 2.024  | 1.000 | 1.000  | 1.061  |          | 1.121  |
| <i>H<sub>obs</sub></i> | 0.000 | –      | 0.000 | 0.000  | 0.000  | 0.000  | 0.688  | 0.000 | 0.000  | 0.059  |          | 0.083  |
| <i>H<sub>exp</sub></i> | 0.000 | –      | 0.000 | 0.000  | 0.000  | 0.000  | 0.522  | 0.000 | 0.000  | 0.059  |          | 0.065  |
| <i>F<sub>is</sub></i>  | –     | –      | –     | –      | –      | –      | –0.331 | –     | –      | –      |          | –0.295 |
| <i>P</i>               | –     | –      | –     | –      | –      | –      | 0.40   | –     | –      | –      |          | –      |
| DIO2                   |       |        |       |        |        |        |        |       |        |        |          |        |
| <i>N</i>               | 48    | 32     | 48    | 48     | 48     | 48     | 46     | 48    | 48     | 48     |          |        |
| <i>na</i>              | 1     | 2      | 1     | 2      | 2      | 1      | 3      | 1     | 1      | 4      |          | 1.800  |
| <i>ne</i>              | 1.000 | 1.560  | 1.000 | 1.465  | 1.087  | 1.000  | 2.130  | 1.000 | 1.000  | 1.727  |          | 1.297  |
| <i>H<sub>obs</sub></i> | 0.000 | 0.365  | 0.000 | 0.396  | 0.042  | 0.000  | 0.696  | 0.000 | 0.000  | 0.417  |          | 0.202  |
| <i>H<sub>exp</sub></i> | 0.000 | 0.359  | 0.000 | 0.321  | 0.081  | 0.000  | 0.536  | 0.000 | 0.000  | 0.425  |          | 0.173  |
| <i>F<sub>is</sub></i>  | –     | –0.292 | –     | –0.237 | +0.486 | –      | –0.301 | –     | –      | +0.020 |          | –0.160 |
| <i>P</i>               | –     | 0.15   | –     | 0.17   | 0.06   | –      | 0.00   | –     | –      | 0.86   |          | 0.01   |
| DIO3                   |       |        |       |        |        |        |        |       |        |        |          |        |
| <i>N</i>               | 48    | 48     | 48    | 47     | 48     | 48     | 48     | 48    | 48     | 48     |          |        |
| <i>na</i>              | 1     | 2      | 1     | 2      | 2      | 1      | 3      | 1     | 1      | 4      |          | 1.800  |
| <i>ne</i>              | 1.000 | 1.600  | 1.000 | 1.513  | 1.021  | 1.000  | 2.331  | 1.000 | 1.000  | 1.690  |          | 1.317  |
| <i>H<sub>obs</sub></i> | 0.000 | 0.333  | 0.000 | 0.277  | 0.021  | 0.000  | 0.729  | 0.000 | 0.000  | 0.396  |          | 0.176  |
| <i>H<sub>exp</sub></i> | 0.000 | 0.379  | 0.000 | 0.351  | 0.021  | 0.000  | 0.577  | 0.000 | 0.000  | 0.413  |          | 0.174  |
| <i>F<sub>is</sub></i>  | –     | +0.121 | –     | +0.213 | –      | –      | –0.267 | –     | –      | +0.041 |          | –0.010 |
| <i>P</i>               | –     | 0.45   | –     | 0.20   | –      | –      | 0.00   | –     | –      | 0.19   |          | 0.01   |
| DIO4                   |       |        |       |        |        |        |        |       |        |        |          |        |
| <i>N</i>               | 48    | 45     | 46    | 48     | 48     | 48     | 46     | 48    | 48     | 44     |          |        |
| <i>na</i>              | 2     | 2      | 2     | 2      | 1      | 1      | 3      | 1     | 1      | 5      |          | 2.000  |
| <i>ne</i>              | 1.043 | 1.697  | 1.044 | 1.863  | 1.000  | 1.000  | 1.720  | 1.000 | 1.000  | 1.908  |          | 1.328  |
| <i>H<sub>obs</sub></i> | 0.042 | 0.400  | 0.044 | 0.396  | 0.000  | 0.000  | 0.500  | 0.000 | 0.000  | 0.523  |          | 0.190  |
| <i>H<sub>exp</sub></i> | 0.041 | 0.416  | 0.043 | 0.468  | 0.000  | 0.000  | 0.423  | 0.000 | 0.000  | 0.482  |          | 0.187  |

(Continued)

TABLE 2  
Continued

| Samples   | Locus  |        |        |        |        |       |        |       |       |        |          |
|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|-------|--------|----------|
|           | HK1    | HK2    | HK3    | GOT1   | GOT2   | GPD   | MDH    | ME    | PGI   | PGM    | All loci |
| $F_{is}$  | -0.011 | +0.038 | -0.011 | +0.156 | -      | -     | -0.184 | -     | -     | -0.087 | -0.014   |
| $P'$      | 1      | 1      | 1      | 0.35   | -      | -     | 0.72   | -     | -     | 0.59   | 0.99     |
| DIO5      |        |        |        |        |        |       |        |       |       |        |          |
| $N$       | 48     | 48     | 48     | 47     | 48     | 48    | 48     | 48    | 48    | 48     |          |
| $na$      | 1      | 2      | 1      | 3      | 2      | 1     | 3      | 1     | 1     | 4      | 1.900    |
| $ne$      | 1.000  | 1.986  | 1.000  | 1.421  | 1.021  | 1.000 | 2.377  | 1.000 | 1.000 | 1.478  | 1.328    |
| $H_{obs}$ | 0.000  | 0.583  | 0.000  | 0.298  | 0.021  | 0.000 | 0.625  | 0.000 | 0.000 | 0.313  | 0.184    |
| $H_{exp}$ | 0.000  | 0.502  | 0.000  | 0.299  | 0.021  | 0.000 | 0.585  | 0.000 | 0.000 | 0.327  | 0.173    |
| $F_{is}$  | -      | -0.165 | -      | +0.005 | -      | -     | -0.069 | -     | -     | +0.045 | -0.062   |
| $P'$      | -      | 0.38   | -      | 0.32   | -      | -     | 0.11   | -     | -     | 0.14   | 0.13     |
| KAF1      |        |        |        |        |        |       |        |       |       |        |          |
| $N$       | 47     | 35     | 46     | 47     | 48     | 48    | 47     | 48    | 48    | 48     |          |
| $na$      | 1      | 2      | 1      | 2      | 1      | 1     | 4      | 1     | 1     | 4      | 1.800    |
| $ne$      | 1.000  | 1.545  | 1.000  | 1.394  | 1.000  | 1.000 | 2.087  | 1.000 | 1.000 | 2.247  | 1.327    |
| $H_{obs}$ | 0.000  | 0.400  | 0.000  | 0.255  | 0.000  | 0.000 | 0.553  | 0.000 | 0.000 | 0.521  | 0.173    |
| $H_{exp}$ | 0.000  | 0.338  | 0.000  | 0.286  | 0.000  | 0.000 | 0.526  | 0.000 | 0.000 | 0.561  | 0.173    |
| $F_{is}$  | -      | -0.120 | -      | +0.107 | -      | -     | -0.051 | -     | -     | +0.072 | +0.008   |
| $P'$      | -      | 0.65   | -      | 0.60   | -      | -     | 0.68   | -     | -     | 0.30   | 0.75     |
| KAF2      |        |        |        |        |        |       |        |       |       |        |          |
| $N$       | 48     | 46     | 48     | 47     | 48     | 48    | 45     | 48    | 48    | 48     |          |
| $na$      | 1      | 2      | 1      | 3      | 2      | 2     | 3      | 1     | 1     | 3      | 1.900    |
| $ne$      | 1.000  | 1.926  | 1.000  | 1.428  | 1.043  | 1.043 | 1.909  | 1.000 | 1.000 | 1.474  | 1.282    |
| $H_{obs}$ | 0.000  | 0.500  | 0.000  | 0.319  | 0.042  | 0.000 | 0.467  | 0.000 | 0.000 | 0.292  | 0.162    |
| $H_{exp}$ | 0.000  | 0.486  | 0.000  | 0.303  | 0.041  | 0.042 | 0.481  | 0.000 | 0.000 | 0.325  | 0.168    |
| $F_{is}$  | -      | -0.029 | -      | -0.053 | -0.011 | +1    | +0.031 | -     | -     | +0.103 | +0.037   |
| $P'$      | -      | 1      | -      | 1      | 1      | 0.01  | 0.25   | -     | -     | 0.03   | 0.08     |
| KAF3      |        |        |        |        |        |       |        |       |       |        |          |
| $N$       | 47     | 47     | 47     | 45     | 47     | 47    | 47     | 47    | 47    | 47     |          |
| $na$      | 2      | 3      | 2      | 2      | 2      | 1     | 3      | 1     | 1     | 3      | 2.000    |
| $ne$      | 1.044  | 1.378  | 1.044  | 1.356  | 1.066  | 1.000 | 1.521  | 1.000 | 1.000 | 1.980  | 1.239    |
| $H_{obs}$ | 0.043  | 0.234  | 0.043  | 0.311  | 0.064  | 0.000 | 0.319  | 0.000 | 0.000 | 0.553  | 0.157    |
| $H_{exp}$ | 0.042  | 0.277  | 0.042  | 0.266  | 0.063  | 0.000 | 0.346  | 0.000 | 0.000 | 0.500  | 0.154    |
| $F_{is}$  | -0.011 | +0.157 | -0.011 | -0.173 | -0.022 | -     | +0.079 | -     | -     | -0.107 | -0.019   |
| $P'$      | 1      | 0.42   | 1      | 0.57   | 1      | -     | 0.03   | -     | -     | 0.42   | 0.65     |
| KOU1      |        |        |        |        |        |       |        |       |       |        |          |
| $N$       | 45     | 45     | 45     | 45     | 45     | 47    | 44     | 47    | 47    | 47     |          |
| $na$      | 2      | 2      | 2      | 2      | 2      | 1     | 3      | 1     | 1     | 5      | 2.100    |
| $ne$      | 1.023  | 1.776  | 1.023  | 1.939  | 1.045  | 1.000 | 1.689  | 1.000 | 1.000 | 2.035  | 1.353    |
| $H_{obs}$ | 0.022  | 0.600  | 0.022  | 0.378  | 0.044  | 0.000 | 0.500  | 0.000 | 0.000 | 0.489  | 0.206    |
| $H_{exp}$ | 0.022  | 0.442  | 0.022  | 0.490  | 0.044  | 0.000 | 0.413  | 0.000 | 0.000 | 0.514  | 0.195    |
| $F_{is}$  | -      | -0.364 | -      | +0.230 | -0.011 | -     | -0.214 | -     | -     | +0.049 | -0.055   |
| $P'$      | -      | 0.02   | -      | 0.14   | 1      | -     | 0.36   | -     | -     | 0.00   | 0.00     |
| KOU2      |        |        |        |        |        |       |        |       |       |        |          |
| $N$       | 48     | 48     | 48     | 48     | 48     | 48    | 46     | 48    | 48    | 48     |          |
| $na$      | 1      | 2      | 1      | 2      | 2      | 1     | 3      | 1     | 1     | 4      | 1.800    |
| $ne$      | 1.000  | 1.777  | 1.000  | 1.997  | 1.110  | 1.000 | 1.636  | 1.000 | 1.000 | 1.522  | 1.304    |
| $H_{obs}$ | 0.000  | 0.479  | 0.000  | 0.500  | 0.104  | 0.000 | 0.478  | 0.000 | 0.000 | 0.313  | 0.187    |
| $H_{exp}$ | 0.000  | 0.442  | 0.000  | 0.504  | 0.100  | 0.000 | 0.393  | 0.000 | 0.000 | 0.347  | 0.179    |
| $F_{is}$  | -      | -0.085 | -      | +0.009 | -0.044 | -     | -0.220 | -     | -     | +0.100 | -0.049   |
| $P'$      | -      | 0.74   | -      | 1      | 1      | -     | 0.35   | -     | -     | 0.13   | 0.75     |
| KOU3      |        |        |        |        |        |       |        |       |       |        |          |
| $N$       | 47     | 47     | 47     | 47     | 47     | 47    | 42     | 47    | 47    | 46     |          |
| $na$      | 2      | 2      | 2      | 1      | 1      | 1     | 4      | 1     | 1     | 5      | 2.000    |
| $ne$      | 1.022  | 1.044  | 1.022  | 1.000  | 1.000  | 1.000 | 2.127  | 1.000 | 1.000 | 2.086  | 1.230    |
| $H_{obs}$ | 0.021  | 0.043  | 0.021  | 0.000  | 0.000  | 0.000 | 0.643  | 0.000 | 0.000 | 0.500  | 0.123    |
| $H_{exp}$ | 0.021  | 0.042  | 0.021  | 0.000  | 0.000  | 0.000 | 0.536  | 0.000 | 0.000 | 0.526  | 0.115    |
| $F_{is}$  | -      | -0.011 | -      | -      | -      | -     | -0.202 | -     | -     | +0.050 | -0.066   |
| $P'$      | -      | 1      | -      | -      | -      | -     | 0.25   | -     | -     | 0.32   | 0.54     |
| KOU4      |        |        |        |        |        |       |        |       |       |        |          |
| $N$       | 48     | 48     | 48     | 48     | 48     | 48    | 48     | 48    | 48    | 48     |          |
| $na$      | 1      | 3      | 1      | 3      | 1      | 2     | 3      | 1     | 1     | 5      | 2.100    |
| $ne$      | 1.000  | 1.773  | 1.000  | 1.065  | 1.000  | 1.043 | 2.170  | 1.000 | 1.000 | 1.816  | 1.287    |
| $H_{obs}$ | 0.000  | 0.375  | 0.000  | 0.063  | 0.000  | 0.000 | 0.583  | 0.000 | 0.000 | 0.500  | 0.152    |
| $H_{exp}$ | 0.000  | 0.441  | 0.000  | 0.062  | 0.000  | 0.041 | 0.545  | 0.000 | 0.000 | 0.454  | 0.154    |
| $F_{is}$  | -      | +0.150 | -      | -0.014 | -      | +1    | -0.072 | -     | -     | -0.103 | +0.014   |
| $P'$      | -      | 0.52   | -      | 1      | -      | 0.01  | 0.19   | -     | -     | 0.79   | 0.16     |
| KOU5      |        |        |        |        |        |       |        |       |       |        |          |
| $N$       | 48     | 45     | 46     | 48     | 48     | 48    | 48     | 48    | 48    | 48     |          |
| $na$      | 2      | 3      | 2      | 2      | 1      | 1     | 3      | 1     | 1     | 3      | 1.900    |
| $ne$      | 1.021  | 1.937  | 1.022  | 1.753  | 1.000  | 1.000 | 2.504  | 1.000 | 1.000 | 1.474  | 1.371    |

(Continued)

TABLE 2  
Continued

| Samples                | Locus  |        |        |             |        |             |        |        |        |        |          |
|------------------------|--------|--------|--------|-------------|--------|-------------|--------|--------|--------|--------|----------|
|                        | HK1    | HK2    | HK3    | GOT1        | GOT2   | GPD         | MDH    | ME     | PGI    | PGM    | All loci |
| <i>H<sub>obs</sub></i> | 0.021  | 0.556  | 0.022  | 0.500       | 0.000  | 0.000       | 0.604  | 0.000  | 0.000  | 0.292  | 0.199    |
| <i>H<sub>exp</sub></i> | 0.021  | 0.489  | 0.022  | 0.434       | 0.000  | 0.000       | 0.607  | 0.000  | 0.000  | 0.325  | 0.190    |
| <i>F<sub>is</sub></i>  | -      | -0.138 | -      | -0.153      | -      | -           | +0.005 | -      | -      | +0.103 | -0.050   |
| <i>P</i>               | -      | 0.71   | -      | 0.33        | -      | -           | 0.01   | -      | -      | 0.03   | 0.01     |
| <b>KOU6</b>            |        |        |        |             |        |             |        |        |        |        |          |
| <i>N</i>               | 48     | 48     | 48     | 45          | 48     | 48          | 45     | 48     | 48     | 48     |          |
| <i>na</i>              | 1      | 1      | 1      | 2           | 2      | 1           | 4      | 1      | 1      | 3      | 1.700    |
| <i>ne</i>              | 1.000  | 1.000  | 1.000  | 1.301       | 1.043  | 1.000       | 2.093  | 1.000  | 1.000  | 1.263  | 1.170    |
| <i>H<sub>obs</sub></i> | 0.000  | 0.000  | 0.000  | 0.222       | 0.042  | 0.000       | 0.533  | 0.000  | 0.000  | 0.188  | 0.099    |
| <i>H<sub>exp</sub></i> | 0.000  | 0.000  | 0.000  | 0.234       | 0.041  | 0.000       | 0.528  | 0.000  | 0.000  | 0.210  | 0.101    |
| <i>F<sub>is</sub></i>  | -      | -      | -      | +0.050      | -0.011 | -           | -0.010 | -      | -      | +0.109 | +0.030   |
| <i>P</i>               | -      | -      | -      | 0.57        | 1      | -           | 0.26   | -      | -      | 0.07   | 0.34     |
| <b>KOU7</b>            |        |        |        |             |        |             |        |        |        |        |          |
| <i>N</i>               | 47     | 47     | 47     | 48          | 48     | 48          | 47     | 48     | 48     | 46     |          |
| <i>na</i>              | 1      | 2      | 1      | 2           | 1      | 1           | 3      | 1      | 2      | 3      | 1.700    |
| <i>ne</i>              | 1.000  | 1.235  | 1.000  | 1.043       | 1.000  | 1.000       | 2.131  | 1.000  | 1.021  | 2.585  | 1.302    |
| <i>H<sub>obs</sub></i> | 0.000  | 0.213  | 0.000  | 0.000       | 0.000  | 0.000       | 0.553  | 0.000  | 0.021  | 0.544  | 0.133    |
| <i>H<sub>exp</sub></i> | 0.000  | 0.192  | 0.000  | 0.041       | 0.000  | 0.000       | 0.537  | 0.000  | 0.021  | 0.620  | 0.141    |
| <i>F<sub>is</sub></i>  | -      | -0.108 | -      | +1          | -      | -           | -0.031 | -      | -      | +0.125 | +0.058   |
| <i>P</i>               | -      | 1      | -      | 0.01        | -      | -           | 0.33   | -      | -      | 0.01   | 0.01     |
| <b>KED1</b>            |        |        |        |             |        |             |        |        |        |        |          |
| <i>N</i>               | 22     | 22     | 22     | 21          | 19     | 22          | 22     | 22     | 22     | 22     |          |
| <i>na</i>              | 2      | 3      | 2      | 3           | 2      | 2           | 3      | 1      | 1      | 4      | 2.300    |
| <i>ne</i>              | 1.047  | 1.203  | 1.047  | 1.334       | 1.232  | 1.095       | 2.038  | 1.000  | 1.000  | 1.913  | 1.291    |
| <i>H<sub>obs</sub></i> | 0.046  | 0.182  | 0.046  | 0.286       | 0.211  | 0.000       | 0.500  | 0.000  | 0.000  | 0.636  | 0.191    |
| <i>H<sub>exp</sub></i> | 0.046  | 0.172  | 0.046  | 0.257       | 0.194  | 0.089       | 0.521  | 0.000  | 0.000  | 0.488  | 0.181    |
| <i>F<sub>is</sub></i>  | -      | -0.057 | -      | -0.116      | -0.091 | +1          | +0.041 | -      | -      | -0.312 | -0.052   |
| <i>P</i>               | -      | 1      | -      | 1           | 1      | 0.02        | 1      | -      | -      | 0.10   | 0.43     |
| <b>KED2</b>            |        |        |        |             |        |             |        |        |        |        |          |
| <i>N</i>               | 46     | 45     | 46     | 48          | 48     | 48          | 46     | 48     | 48     | 48     |          |
| <i>na</i>              | 1      | 2      | 1      | 1           | 2      | 2           | 4      | 2      | 1      | 4      | 2.000    |
| <i>ne</i>              | 1.000  | 1.976  | 1.000  | 1.000       | 1.021  | 1.087       | 1.576  | 1.021  | 1.000  | 2.169  | 1.285    |
| <i>H<sub>obs</sub></i> | 0.000  | 0.533  | 0.000  | 0.000       | 0.021  | 0.000       | 0.413  | 0.021  | 0.000  | 0.625  | 0.161    |
| <i>H<sub>exp</sub></i> | 0.000  | 0.499  | 0.000  | 0.000       | 0.021  | 0.081       | 0.370  | 0.021  | 0.000  | 0.545  | 0.154    |
| <i>F<sub>is</sub></i>  | -      | -0.069 | -      | -           | -      | +1          | -0.119 | -      | -      | -0.150 | -0.050   |
| <i>P</i>               | -      | 0.76   | -      | -           | -      | <b>0.00</b> | 0.83   | -      | -      | 0.01   | 0.00     |
| <b>KED3</b>            |        |        |        |             |        |             |        |        |        |        |          |
| <i>N</i>               | 48     | 48     | 48     | 48          | 48     | 48          | 48     | 48     | 48     | 48     |          |
| <i>na</i>              | 2      | 2      | 2      | 2           | 3      | 1           | 5      | 2      | 2      | 4      | 2.500    |
| <i>ne</i>              | 1.205  | 1.519  | 1.205  | 1.021       | 1.159  | 1.000       | 1.973  | 1.064  | 1.110  | 2.394  | 1.365    |
| <i>H<sub>obs</sub></i> | 0.188  | 0.354  | 0.188  | 0.021       | 0.125  | 0.000       | 0.563  | 0.021  | 0.063  | 0.667  | 0.219    |
| <i>H<sub>exp</sub></i> | 0.0172 | 0.345  | 0.172  | 0.021       | 0.139  | 0.000       | 0.498  | 0.061  | 0.100  | 0.588  | 0.210    |
| <i>F<sub>is</sub></i>  | -0.093 | -0.026 | -0.093 | -           | +0.100 | -           | -0.131 | +0.662 | +0.376 | -0.135 | -0.044   |
| <i>P</i>               | 1      | 1      | 1      | -           | 0.21   | -           | 0.22   | 0.03   | 0.10   | 0.87   | 0.33     |
| <b>KED4</b>            |        |        |        |             |        |             |        |        |        |        |          |
| <i>N</i>               | 48     | 48     | 47     | 48          | 48     | 48          | 48     | 48     | 48     | 48     |          |
| <i>na</i>              | 2      | 3      | 1      | 4           | 2      | 2           | 3      | 2      | 3      | 5      | 2.700    |
| <i>ne</i>              | 1.110  | 1.481  | 1.000  | 1.325       | 1.156  | 1.043       | 1.529  | 1.110  | 1.088  | 2.250  | 1.309    |
| <i>H<sub>obs</sub></i> | 0.104  | 0.271  | 0.000  | 0.229       | 0.104  | 0.000       | 0.291  | 0.063  | 0.042  | 0.563  | 0.167    |
| <i>H<sub>exp</sub></i> | 0.100  | 0.328  | 0.000  | 0.248       | 0.137  | 0.042       | 0.350  | 0.100  | 0.081  | 0.561  | 0.195    |
| <i>F<sub>is</sub></i>  | -0.044 | +0.177 | -      | +0.077      | +0.239 | +1          | +0.168 | +0.376 | +0.491 | -0.002 | +0.145   |
| <i>P</i>               | 1      | 0.01   | -      | 0.05        | 0.21   | 0.01        | 0.22   | 0.10   | 0.06   | 0.73   | 0.00     |
| <b>KED5</b>            |        |        |        |             |        |             |        |        |        |        |          |
| <i>N</i>               | 42     | 42     | 41     | 42          | 42     | 42          | 42     | 42     | 42     | 42     |          |
| <i>na</i>              | 2      | 2      | 22     | 3           | 2      | 1           | 4      | 2      | 1      | 5      | 2.400    |
| <i>ne</i>              | 1.049  | 1.569  | 1.050  | 1.392       | 1.208  | 1.000       | 1.627  | 1.074  | 1.000  | 2.701  | 1.367    |
| <i>H<sub>obs</sub></i> | 0.048  | 0.286  | 0.049  | 0.095       | 0.143  | 0.000       | 0.429  | 0.024  | 0.000  | 0.524  | 0.160    |
| <i>H<sub>exp</sub></i> | 0.047  | 0.367  | 0.048  | 0.285       | 0.174  | 0.000       | 0.390  | 0.070  | 0.000  | 0.637  | 0.202    |
| <i>F<sub>is</sub></i>  | -0.012 | +0.224 | -0.013 | +0.668      | +0.183 | -           | -0.101 | +0.661 | -      | +0.180 | +0.211   |
| <i>P</i>               | 1      | 0.20   | 1      | <b>0.00</b> | 0.31   | -           | 0.88   | 0.04   | -      | 0.14   | 0.00     |
| <b>All</b>             |        |        |        |             |        |             |        |        |        |        |          |
| <i>F<sub>is</sub></i>  | -0.044 | -0.060 | -0.044 | 0.061       | 0.105  | 0.856       | -0.113 | 0.488  | 0.130  | 0.026  |          |
| <i>P</i>               | 1      | 0.50   | 1      | 0.00        | 0.06   | 0.00        | 1      | 0.00   | 0.02   | 0.05   |          |

Bold signifies significant values after correction using Bonferroni's method.  
*N<sub>s</sub>* = observed number of alleles; *ne* = effective number of alleles; *N* = sample size; *H<sub>obs</sub>* = observed heterozygosity; *H<sub>exp</sub>* = expected heterozygosity; *F<sub>is</sub>* = inbreeding coefficient, measures the reduction of heterozygosity of a subpopulation caused by non-random mating; *P* is the probability for rejecting Hardy-Weinberg equilibrium.

TABLE 3  
AMOVA of *Ae. aegypti* population from Senegal using four different grouping factors

| Source of variation             | df    | Sum of squares | Variance components | Percentage of variation | $\Phi$ Statistics   | P value   |
|---------------------------------|-------|----------------|---------------------|-------------------------|---------------------|-----------|
| (a) Geographical localization   |       |                |                     |                         |                     |           |
| Among groups                    | 4     | 38.827         | 0.013               | 1.93                    | $\Phi_{CT} = 0.019$ | 0.0059    |
| Among populations within groups | 20    | 77.105         | 0.035               | 5.42                    | $\Phi_{SC} = 0.055$ | < 0.00001 |
| Within populations              | 2,145 | 1,374.438      | 0.641               | 92.65                   | $\Phi_{ST} = 0.074$ | < 0.00001 |
| Total                           | 2,169 | 1,490.370      | 0.692               |                         |                     |           |
| (b) Vegetation type             |       |                |                     |                         |                     |           |
| Among groups                    | 2     | 29.257         | 0.018               | 2.64                    | $\Phi_{CT} = 0.026$ | 0.0020    |
| Among populations within groups | 22    | 86.675         | 0.038               | 5.47                    | $\Phi_{SC} = 0.056$ | < 0.00001 |
| Within populations              | 2,145 | 1,374.438      | 0.641               | 91.89                   | $\Phi_{ST} = 0.081$ | < 0.00001 |
| Total                           | 2,169 | 1,490.370      | 0.697               |                         |                     |           |
| (c) Subspecies                  |       |                |                     |                         |                     |           |
| Among groups                    | 1     | 21.124         | 0.025               | 3.56                    | $\Phi_{CT} = 0.036$ | 0.0029    |
| Among populations within groups | 23    | 94.808         | 0.040               | 5.70                    | $\Phi_{SC} = 0.059$ | < 0.00001 |
| Within populations              | 2,145 | 1,374.438      | 0.641               | 90.74                   | $\Phi_{ST} = 0.093$ | < 0.00001 |
| Total                           | 2,169 | 1,490.370      | 0.706               |                         |                     |           |
| (d) Type of breeding site       |       |                |                     |                         |                     |           |
| Among groups                    | 2     | 30.073         | 0.016               | 2.36                    | $\Phi_{CT} = 0.024$ | 0.0029    |
| Among populations within groups | 22    | 85.859         | 0.038               | 5.44                    | $\Phi_{SC} = 0.056$ | < 0.00001 |
| Within populations              | 2,145 | 1,374.438      | 0.641               | 92.20                   | $\Phi_{ST} = 0.078$ | < 0.00001 |
| Total                           | 2,169 | 1,490.370      | 0.695               |                         |                     |           |

AMOVA was performed using groups designed on geographical, ecological and ethological characteristics (see Table 1 and Figure 1). Computation (a) was made with five geographical groups (Barkedji, Diourbel, Kaffrine, Koungheul, and Kedougou). Computation (b) was made with three vegetation groups (savannah, sahelian, and forest gallery areas). Computation (c) was made on two groups based on subspecies (domestic and sylvatic forms). Computation (d) was made with three groups based on breeding site type (metallic barrel, terracotta jar, and tree hole).

DF = degrees of freedom; P = probability of obtaining a more extreme component estimate by chance alone (1,000 permutations).

samples was highly significant ( $F_{ST} = +0.078$ ,  $P < 10^{-6}$ ; Table 4). When samples were pooled according to collection origin, those collected in Barkedji ( $F_{ST} = +0.046$ ,  $P < 10^{-6}$ ), Diourbel ( $F_{ST} = +0.055$ ,  $P < 10^{-6}$ ), Kaffrine ( $F_{ST} = +0.043$ ,  $P < 10^{-6}$ ),

and Kedougou ( $F_{ST} = +0.046$ ,  $P < 10^{-6}$ ) were 2- to 10-fold less differentiated than those collected in the Koungheul area ( $F_{ST} = +0.109$ ,  $P < 10^{-6}$ ).

When estimating differentiation between pairs of samples,

TABLE 4  
Population differentiation of *Ae. aegypti* in Senegal, 2002–2003, as shown by isoenzyme polymorphism analysis

| Comparison        | N  | $F_{ST}$ (P)              |                            |                             |                           |                            |                           |                             |                            |                           |                            |                            |
|-------------------|----|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                   |    | HK1                       | HK2                        | HK3                         | GOT1                      | GOT2                       | GPD                       | MDH                         | ME                         | PGI                       | PGM                        | Total                      |
| All samples       | 25 | 0.034<br>( $< 10^{-6}$ )  | 0.108<br>( $< 10^{-6}$ )   | 0.036<br>( $< 10^{-6}$ )    | 0.158<br>( $< 10^{-6}$ )  | 0.032<br>( $< 10^{-6}$ )   | 0.010<br>( $< 10^{-6}$ )  | 0.049<br>( $< 10^{-6}$ )    | 0.019<br>( <b>0.0001</b> ) | 0.027<br>( $< 10^{-6}$ )  | 0.05<br>( $< 10^{-6}$ )    | 0.078<br>( $< 10^{-6}$ )   |
| Barkedji          | 5  | -0.003<br>(0.497)         | 0.085<br>( $< 10^{-6}$ )   | -0.003<br>(0.497)           | 0.194<br>( $< 10^{-6}$ )  | 0.016<br>(0.107)           | 0.045<br>( <b>0.012</b> ) | 0.012<br>( <b>0.044</b> )   | -                          | 0.007<br>(0.229)          | 0.017<br>( <b>0.0004</b> ) | 0.046<br>( $< 10^{-6}$ )   |
| Barkedji          | 2  | -                         | 0.170<br>( $< 10^{-6}$ )   | -                           | -0.014<br>(1.000)         | -                          | -                         | 0.013<br>(0.178)            | -                          | -0.006<br>(0.748)         | -0.008<br>(0.453)          | 0.025<br>( $< 10^{-6}$ )   |
| Diagali           | 2  | -                         | -0.005<br>(0.485)          | -                           | 0.091<br>( <b>0.001</b> ) | 0.008<br>(0.427)           | 0.038<br>(0.181)          | 0.024<br>( <b>0.044</b> )   | -                          | -                         | 0.020<br>(0.115)           | 0.034<br>( <b>0.002</b> )  |
| Diourbel          | 5  | 0.009<br>(0.359)          | 0.085<br>( $< 10^{-6}$ )   | 0.008<br>(0.071)            | 0.067<br>( $< 10^{-6}$ )  | 0.006<br>(0.228)           | -                         | 0.046<br>( $< 10^{-6}$ )    | -                          | -                         | 0.024<br>( <b>0.002</b> )  | 0.055<br>( $< 10^{-6}$ )   |
| Gallo             | 2  | -                         | -                          | -                           | 0.130<br>( <b>0.004</b> ) | -0.001<br>(0.574)          | -                         | 0.018<br>(0.122)            | -                          | -                         | 0.096<br>( <b>0.018</b> )  | 0.066<br>( <b>0.002</b> )  |
| N'Dione           | 2  | 0.106<br>(0.498)          | -0.008<br>(0.613)          | 0.012<br>(0.238)            | 0.035<br>( <b>0.038</b> ) | 0.000<br>(1.000)           | -                         | 0.138<br>( $< 10^{-6}$ )    | -                          | -                         | 0.009<br>( <b>0.029</b> )  | 0.051<br>( $< 10^{-6}$ )   |
| Kaffrine          | 3  | 0.011<br>(0.220)          | 0.080<br>( <b>0.0003</b> ) | 0.011<br>(0.209)            | -0.010<br>(0.974)         | 0.005<br>(0.212)           | -0.0002<br>(0.330)        | 0.010<br>(0.191)            | -                          | -                         | 0.079<br>( $< 10^{-6}$ )   | 0.043<br>( $< 10^{-6}$ )   |
| Koungheul         | 7  | -0.002<br>(0.338)         | 0.145<br>( $< 10^{-6}$ )   | -0.002<br>(0.224)           | 0.257<br>( $< 10^{-6}$ )  | 0.019<br>( <b>0.009</b> )  | -0.0001<br>(0.145)        | 0.047<br>( $< 10^{-6}$ )    | -                          | -0.0001<br>(1.000)        | 0.056<br>( $< 10^{-6}$ )   | 0.109<br>( $< 10^{-6}$ )   |
| Darou Koung Koung | 2  | 0.001<br>(0.485)          | -0.009<br>(1.000)          | 0.001<br>(0.486)            | 0.012<br>(0.146)          | 0.002<br>(0.442)           | -                         | 0.052<br>( <b>0.00001</b> ) | -                          | -                         | 0.024<br>( <b>0.018</b> )  | 0.018<br>( <b>0.0015</b> ) |
| Thiakhatie        | 2  | 0.0002<br>(0.494)         | 0.245<br>( $< 10^{-6}$ )   | 0.0002<br>(0.493)           | 0.014<br>(0.491)          | -                          | -0.0004<br>(0.494)        | -0.009<br>(0.852)           | -                          | -                         | -0.006<br>(0.653)          | 0.052<br>( $< 10^{-6}$ )   |
| Ribo Kodiolo      | 2  | 0.000<br>(1.000)          | 0.380<br>( $< 10^{-6}$ )   | 0.001<br>(0.489)            | 0.079<br>( <b>0.004</b> ) | 0.011<br>(0.494)           | -                         | 0.011<br>(0.121)            | -                          | -                         | 0.011<br>(0.089)           | 0.111<br>( $< 10^{-6}$ )   |
| Kedougou          | 5  | 0.028<br>( <b>0.002</b> ) | 0.136<br>( $< 10^{-6}$ )   | 0.052<br>( <b>0.00005</b> ) | 0.071<br>( $< 10^{-6}$ )  | 0.024<br>( $< 10^{-6}$ )   | 0.004<br>( <b>0.005</b> ) | 0.023<br>(0.081)            | -0.005<br>(0.405)          | 0.014<br>( <b>0.031</b> ) | 0.007<br>( <b>0.003</b> )  | 0.046<br>( $< 10^{-6}$ )   |
| Fadiga            | 2  | 0.018<br>(0.324)          | 0.360<br>( $< 10^{-6}$ )   | 0.018<br>(0.327)            | 0.175<br>( <b>0.001</b> ) | 0.102<br>( <b>0.022</b> )  | -0.034<br>(1.000)         | 0.772<br>( <b>0.046</b> )   | -0.009<br>(1.000)          | -                         | -0.005<br>(0.874)          | 0.145<br>( $< 10^{-6}$ )   |
| PK10              | 3  | 0.012<br>(0.160)          | -0.008<br>(0.477)          | 0.053<br>( <b>0.001</b> )   | 0.064<br>( $< 10^{-6}$ )  | 0.013<br>( <b>0.0004</b> ) | -0.001<br>(0.326)         | 0.012<br>(0.401)            | -0.014<br>(0.800)          | 0.007<br>(0.123)          | 0.010<br>( <b>0.0004</b> ) | 0.014<br>( $< 10^{-6}$ )   |

Significant values ( $P < 0.05$ ) are in bold  
N = number of samples; P = probability of homogeneity.

$\theta_{ij}$  ( $F_{ST}$ ) ranged from  $-0.010$  to  $0.2454$  ( $0.077 \pm 0.049$ ; Table 5): from  $-0.010$  to  $0.2314$  for the "Savannah-sahelian" (S) group ( $0.076 \pm 0.050$ ) and from  $0.0101$  to  $0.1456$  for the "Forest" (F) group ( $0.050 \pm 0.042$ ). For heterologous combinations,  $\theta_{ij}$  ( $F_{ST}$ ) ranged from  $0.0041$  to  $0.2454$  ( $0.082 \pm 0.049$ ). Of 300 combinations, 9 showed non-significant differentiation, among which 8 were S combinations (4.2% in the S group) and 1 was a heterologous combination (1% in the heterologous group). Thus, genetic differentiation of S combinations seemed to be lower than other combinations. The mean  $\theta_{ij-S}$ ,  $\theta_{ij-TFS}$ , and  $\theta_{ij-Heterologous}$  were similar ( $P = 0.07$ ).

In the neighbour joining dendrogram (Figure 2), allozyme data did not cluster in populations according to their geographical location.

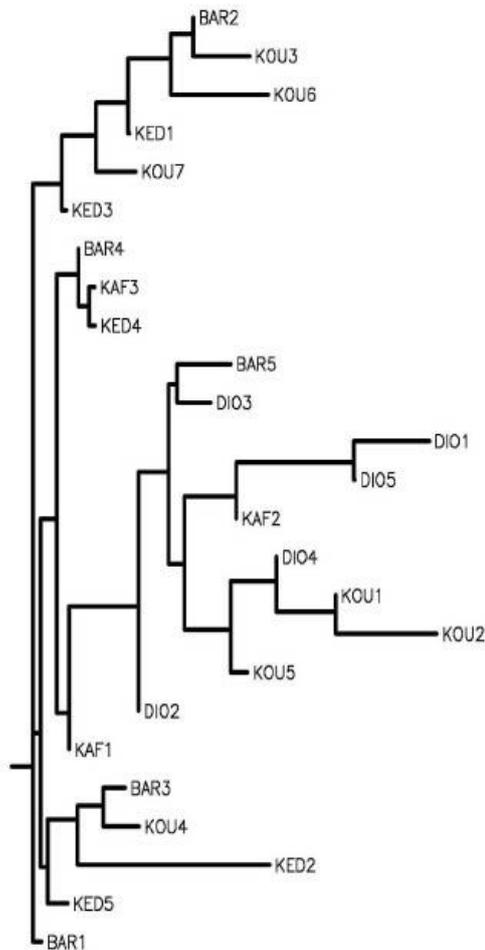


FIGURE 2. Neighbor-joining tree based on pairwise  $F_{ST}$  distances between collections.

When estimating genetic divergence according to geographic distance, the relation ( $F_{ST}/[1 - F_{ST}] = a + b[\ln \text{distance}]$ ) was not significant when considering all samples ( $P = 0.10$ ). The correlation was not significant among samples from the Barkedji ( $P = 0.32$ ), Diourbel ( $P = 0.61$ ), Kafrine ( $P = 0.67$ ), and Kedougou ( $P = 0.09$ ) areas, whereas it was significant among samples from the Koungheul area ( $P = 0.03$ ; Figure 3).

## DISCUSSION

Our objectives were to analyze the genetic significances of the morphologic and behavioral differences observed among *Ae. aegypti* populations from Senegal. The results obtained showed that the overall  $F_{ST}$  value ( $+0.078$ ) is low, whereas it is significant. This result is consistent with other studies taking place in West Africa.<sup>14,29,30</sup> In Nigeria, *Ae. aegypti* from rural and urban areas are genetically similar.<sup>31</sup> As in Senegal, many of these populations are dark in color but show white spotting on the first abdominal tergite, a characteristic of the domestic *Ae. aegypti aegypti* studied by Petersen<sup>32</sup> in East Africa.

The "domestic" populations showed a decreased genetic diversity compared with "sylvatic" populations from Kedougou. In fact, we observed that the "domestic" populations had a significantly lower expected heterozygosity than the "sylvatic" ones. Domestic populations may have come from populations exhibiting higher population diversity. In that case, relatively small numbers of individuals involved in each colonization event, and an initial slow growth rate of the founding populations could have created a genetic bottleneck that further reduced variation in the "domestic" populations. Because *Ae. aegypti* has a short flight range ( $\sim 10\text{--}400$  m) during its entire lifetime,<sup>33-35</sup> only passive migrations through the accidental transportation of eggs, larvae, or adults of mosquitoes or the adaptation of sylvatic populations in a changing environment could explain the establishment of this domestic form. Indeed, it is probable that the domestic populations evolved from sylvatic ones through an adaptation after deforestation for cultivation, urbanization, and desertification that have greatly reduced the natural sylvatic habitat. During these events, few founding individuals were probably involved, leading to genetic bottlenecks that support this hypothesis.

Although *Ae. aegypti* populations from Senegal are significantly structured, a low genetic differentiation was observed for the domestic populations. This level of differentiation is similar to the one observed for Asian domestic *Ae. aegypti* in Cambodia<sup>36</sup> and Vietnam.<sup>37</sup> In these countries, it has been shown that the population structure is shaped by human activities, especially by water storage practices. In Senegal, in the villages where the "domestic" samples were collected, piped water supplies are generally not available, leading to water storage in clay jars or metallic barrels within houses. Dwelling in the villages are organized in residential compounds, which comprise one or more households, together with some members of the extended family. Some domestic animals also live inside the compound. Thus, host-vector contacts with this endophagic, endophilic mosquito are quite frequent. It has been proposed that dispersal is driven by the search for oviposition sites.<sup>35,38</sup> The accumulation of breeding sites (for females to lay eggs) at the vicinity of houses and the

TABLE 5  
 $\theta_{ij} (F_{ST})$  estimates computed using allozyme variations for all pair of samples according to the ecological characteristics of the sampling areas  
 Savannah and sahelian areas

|      | BAR1   | BAR2   | BAR3   | BAR4   | BAR5   | DIO1   | DIO2   | DIO3   | DIO4   | DIO5   | KOU1   | KOU2   | KOU3   | KOU4   | KOU5   | KOU6   | KOU7   | KAF1   | KAF2   | KAF3   | KED1   | KED2   | KED3   | KED4   | KED5 | KEDI |  |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------|------|--|
| BAR2 | 0.0250 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |      |      |  |
| BAR3 | 0.0128 | 0.0471 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |      |      |  |
| BAR4 | 0.0198 | 0.0592 | 0.0532 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |      |      |  |
| BAR5 | 0.0665 | 0.1209 | 0.0753 | 0.0336 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |      |      |  |
| DIO1 | 0.0920 | 0.0885 | 0.0504 | 0.1747 | 0.1348 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |      |      |  |
| DIO2 | 0.0204 | 0.0516 | 0.0242 | 0.0185 | 0.0323 | 0.0659 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |      |      |  |
| DIO3 | 0.0459 | 0.0731 | 0.0397 | 0.0387 | 0.0304 | 0.0700 | 0.0104 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |      |      |  |
| DIO4 | 0.0709 | 0.1261 | 0.0849 | 0.0356 | 0.0423 | 0.1511 | 0.0185 | 0.0510 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |      |      |  |
| DIO5 | 0.0975 | 0.1817 | 0.0562 | 0.1041 | 0.0671 | 0.0266 | 0.0519 | 0.0527 | 0.0833 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |      |      |  |
| KOU1 | 0.0839 | 0.1496 | 0.1051 | 0.0417 | 0.0324 | 0.1538 | 0.0310 | 0.0397 | 0.0064 | 0.0006 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |      |      |  |
| KOU3 | 0.1509 | 0.2075 | 0.1568 | 0.0930 | 0.0819 | 0.2314 | 0.0698 | 0.0974 | 0.0123 | 0.1247 | 0.0182 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |      |      |  |
| KOU5 | 0.0452 | 0.0194 | 0.0673 | 0.0984 | 0.1695 | 0.1381 | 0.0758 | 0.1273 | 0.1348 | 0.2116 | 0.1798 | 0.2702 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |      |      |  |
| KOU4 | 0.0304 | 0.0735 | 0.0200 | 0.0665 | 0.1053 | 0.1233 | 0.0412 | 0.0817 | 0.0789 | 0.0829 | 0.1182 | 0.1480 | 0.0523 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |      |      |  |
| KOU6 | 0.0762 | 0.1302 | 0.0616 | 0.0631 | 0.0481 | 0.0923 | 0.0181 | 0.0264 | 0.0177 | 0.0527 | 0.0267 | 0.0427 | 0.1479 | 0.0602 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |      |      |  |
| KOU7 | 0.0320 | 0.0291 | 0.0502 | 0.0511 | 0.1211 | 0.1782 | 0.0670 | 0.1065 | 0.1116 | 0.1696 | 0.1515 | 0.1943 | 0.0302 | 0.0538 | 0.1360 | 0.0965 |        |        |        |        |        |        |        |        |      |      |  |
| KAF1 | 0.0078 | 0.0413 | 0.0376 | 0.010  | 0.0413 | 0.1311 | 0.0102 | 0.0332 | 0.0351 | 0.0890 | 0.0472 | 0.0999 | 0.0682 | 0.0432 | 0.0518 | 0.0815 | 0.0417 |        |        |        |        |        |        |        |      |      |  |
| KAF2 | 0.0504 | 0.1284 | 0.0388 | 0.0380 | 0.0510 | 0.0538 | 0.0122 | 0.0427 | 0.0252 | 0.0254 | 0.0408 | 0.0695 | 0.1545 | 0.0384 | 0.0099 | 0.1085 | 0.1227 | 0.0433 |        |        |        |        |        |        |      |      |  |
| KAF3 | 0.0238 | 0.0566 | 0.0632 | 0.0015 | 0.0633 | 0.1589 | 0.0273 | 0.0706 | 0.0486 | 0.1446 | 0.0661 | 0.1102 | 0.0759 | 0.0757 | 0.0943 | 0.0752 | 0.0596 | 0.0067 | 0.0725 |        |        |        |        |        |      |      |  |
| KED3 | 0.0216 | 0.0491 | 0.0378 | 0.0286 | 0.0859 | 0.1456 | 0.0531 | 0.0885 | 0.0865 | 0.1221 | 0.1140 | 0.1576 | 0.0510 | 0.0386 | 0.1063 | 0.1022 | 0.0189 | 0.0372 | 0.0030 | 0.0307 |        |        |        |        |      |      |  |
| KED4 | 0.0274 | 0.0641 | 0.0686 | 0.0061 | 0.0638 | 0.1683 | 0.0504 | 0.0900 | 0.0725 | 0.1452 | 0.0882 | 0.1366 | 0.0787 | 0.0723 | 0.1134 | 0.1096 | 0.0446 | 0.0151 | 0.0669 | 0.0041 | 0.0131 |        |        |        |      |      |  |
| KED5 | 0.0220 | 0.0709 | 0.0555 | 0.0192 | 0.0604 | 0.1471 | 0.0404 | 0.0830 | 0.0567 | 0.1118 | 0.0788 | 0.1211 | 0.0689 | 0.0452 | 0.0871 | 0.1021 | 0.0444 | 0.0174 | 0.0583 | 0.0207 | 0.0171 | 0.0101 |        |        |      |      |  |
| KEDI | 0.0427 | 0.0269 | 0.0614 | 0.0394 | 0.0986 | 0.1669 | 0.0469 | 0.0876 | 0.0775 | 0.1635 | 0.1134 | 0.1327 | 0.0224 | 0.0418 | 0.0953 | 0.0558 | 0.0240 | 0.0316 | 0.0991 | 0.0382 | 0.0267 | 0.0379 | 0.0340 |        |      |      |  |
| KED2 | 0.0848 | 0.1939 | 0.0887 | 0.0815 | 0.1247 | 0.1975 | 0.0988 | 0.1447 | 0.1209 | 0.0904 | 0.1369 | 0.1867 | 0.1992 | 0.0728 | 0.1199 | 0.2454 | 0.1395 | 0.0724 | 0.0721 | 0.1062 | 0.0487 | 0.0778 | 0.0657 | 0.1456 |      |      |  |

Non-significant differentiations are underlined.

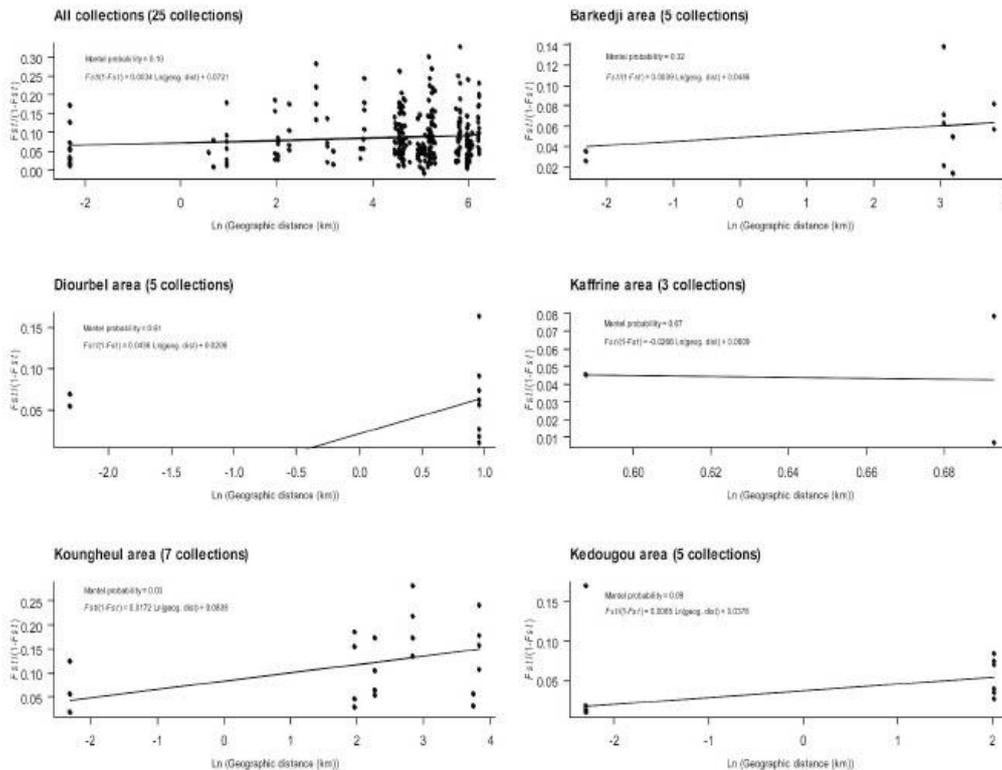


FIGURE 3. Regression analysis of pairwise  $F_{st}(1 - F_{st})$  regressed on pairwise  $\ln(\text{geographic distances})$  between collections.

presence of human beings (for females to feed on) could enhance *Ae. aegypti* movements and genetic exchange and reduce the genetic differentiation explaining the moderate level of differentiation observed in the “domestic” samples.

In the Kedougou region, the samples analyzed were collected in the forest gallery area and belong to the “sylvatic” zoophilic form. The larvae inhabit natural breeding sites such as tree holes that are subjected to seasonal rainfall (in contrast to water storage containers that are available throughout the year). The search for oviposition sites and for blood meals depends on numerous factors such as the amount of rainfall, the availability of tree species tending to generate tree holes, and the presence of wild vertebrate hosts. The complexity of these factors may explain the higher level of differentiation observed. Moreover seasonal fluctuations in mosquito populations may also explain the higher differentiation observed, because it has been shown that the dynamics and genetic structure of *Ae. aegypti* populations changes according to the seasons.<sup>30</sup> This study was undertaken during the dry season when all natural breeding sites were dry. Samples were collected by scraping tree holes with spoons to collect *Aedes* eggs, known to be resistant to desiccation, and flooded in the laboratory for hatching. These eggs could have represented

an accumulation laid by several populations during different years and throughout the year according to the flooding of the breeding sites.

The departure from Hardy-Weinberg equilibrium observed in two populations from the Kedougou area was always associated with heterozygote deficiencies. This could be because of factors such as null alleles, inbreeding, or a Wahlund effect. The occurrence of null alleles in allozymes is very rare.<sup>40,41</sup> The fact to have sampled several offsprings from the same female that has laid its eggs in the same breeding site or in breeding sites of different nature—phenomenon already known in *Ae. aegypti*<sup>35</sup>—can be a cause of inbreeding. To avoid such a phenomenon, we tested for the same geographical area, some individuals belonging to various breeding sites and various localities (Fadiga and PK 10). Furthermore, inbreeding could be excluded as an explanation because deficits would be expected in all loci. Therefore, the Wahlund effect is the most plausible explanation of the heterozygote deficiency in Kedougou. Such a phenomenon may be explained by the sampling method we used, which was egg collections in tree holes as mentioned above.

In our study, the geographical distance between populations was not a good indicator of the genetic distance between

populations. Various extrinsic forces could disrupt genetic isolation by distance as has been shown in northeastern Mexico<sup>42</sup>; arid environment that cause populations to undergo genetic bottlenecks or human transportations of eggs or larvae that could cause geographically distant populations to become genetically similar, thus reducing genetic isolation by distance.

The findings of this study allowed us to put forward two hypotheses. The first one is that the domestic *Ae. aegypti* populations may have a sylvatic origin. The genetic relatedness, showing a clear persistence of gene flow between sylvatic and domestic populations, supports this hypothesis.

The domestication process could have been associated with a series of morphologic, behavioral, and demographic changes as previously reported for different populations in Burkina Faso<sup>14</sup> and in other arthropods like Triatomids.<sup>43,44</sup> This evolution could be associated with three key factors: 1) exploitation of human blood as a food source (anthropophagy), 2) adaptation to the human host environment (i.e., artificial containers as breeding sites), and 3) progressive reliance on human activities as a means for dispersal by passive transport. This process involves specialization and simplification reflected in genetics and phenotypic characteristics.<sup>44</sup> Genetic simplification during domestication may occur through founder effects followed by intraspecific competition. In addition, when a newly founded population becomes isolated from its sylvatic focus, a further loss of genetic variability can be expected.<sup>43</sup> These findings implicate environmental conditions, ecological factors, and human activities as factors shaping the genetic structure of *Ae. aegypti* populations in Senegal.

The second hypothesis is that the "domestic" form could be a recent hybrid between the North African domestic *Ae. a. aegypti* and the sylvatic West African *Ae. a. formosus* as suggested by Tabachnick.<sup>20</sup> He supposed that domesticity was not sufficiently established to maintain a distinct sympatric population. This hypothesis could explain the low level of genetic differentiation observed in Senegal and that this form has a dark color as the *formosus* form but harbors white spotting on the first abdominal tergite and shows a preference for human hosts. However, the absence of *Ae. aegypti aegypti* populations remains questionable because of the lack of reliable methods to distinguish the subspecies. The morphologic keys based on color are not sufficiently accurate to distinguish *Ae. aegypti aegypti* from *Ae. aegypti formosus* or to identify intermediate forms. Additional studies, with microsatellite markers, that provide often a more sensitive measure of divergence than isoenzyme markers will help to distinguish populations that may have recently diverged.<sup>45,46</sup> Moreover, studying their ecology, morphology, and vector competence, as well as the development of more reliable taxonomic tools, is needed to better characterize these mosquito populations and should help elucidate the epidemiology of dengue in Senegal.

Received November 12, 2007. Accepted for publication April 3, 2008.

Acknowledgments: The authors thank Mamoudou Diallo, Ignace Rakotoarivony, Pedro Rodriguez Menendez, Mouhamadou Lamine Soumare, and Amadou Thiaw for technical assistance and help during field investigations and Dr. Scott C. Weaver, Director for Tropical and Emerging Infectious Diseases, UTMB Center for Biodefense and Emerging Infectious Diseases, Departments of Pathology, Microbi-

ology and Immunology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, for improving the manuscript with helpful suggestions.

Financial support: This work received financial support from the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Disease (TDR): A00398.

Authors' addresses: Karine Huber, UPR Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes, Campus International de Baillarguet, TA A-15/G, 34398 Montpellier cedex 5, France, Tel: 33-4-67-59-37-24, Fax: 33-4-67-59-37-98, E-mail: karine.huber@cirad.fr. Yamar Ba, Ibrahima Dia, Amadou A. Sall, and Mawlouth Diallo, Institut Pasteur, 36 Avenue Pasteur, BP 220 Dakar, Senegal. Christian Mathiot, WHO Office in Lyon, 58 Avenue Debourg, 69007 Lyon, France.

Reprint requests: Karine Huber, UPR Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes, Campus International de Baillarguet, TA A-15/G, 34398 Montpellier cedex 5, France, E-mail: karine.huber@cirad.fr.

## REFERENCES

- Gubler DJ, 1997. Dengue and dengue hemorrhagic fever; its history and resurgence as a global public health problem. Gubler DJ, Kuno G, eds. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. New York: CAB International, 1-22.
- Gubler DJ, 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 11: 480-496.
- Tassniyom S, Vasanawathana S, Chirawatkul A, Rojanasuphot S, 1993. Failure of high-dose methylprednisolone in established dengue shock syndrome: a placebo-controlled, double-blind study. *Pediatrics* 92: 111-115.
- Monath TP, Lee VH, Wilson DC, Fagbami A, Tomori O, 1974. Arbovirus studies in Nupeko forest, a possible natural focus of yellow fever virus in Nigeria. I. Description of the area and serological survey of humans and other vertebrate hosts. *Trop Soc Trop Med H* 68: 30-38.
- Fagbami AH, Monath TP, Fabiyi A, 1977. Dengue virus infections in Nigeria: a survey for antibodies in monkeys and humans. *Trop Soc Trop Med H* 71: 60-65.
- Saluzzo JF, Cornet M, Castagnet P, Rey C, Digoutte JP, 1986. Isolation of dengue 2 and dengue 4 viruses from patients in Senegal. *Trop Soc Trop Med H* 80: 85.
- Cornet M, 1993. *Dengue Virus in Africa. Monograph on Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever, SEARO 22*. Geneva: World Health Organization.
- Zeller HG, Traore-Lamizana M, Monlun E, Hervy JP, Mondo M, Digoutte JP, 1992. Dengue-2 virus isolation during an epizootic in southeast Senegal in November, 1990. *Res Virol* 143: 101-102.
- Traore-Lamizana M, Zeller H, Monlun E, Mondo M, Hervy JP, Adam F, Digoutte JP, 1994. Dengue 2 outbreak in southeast Senegal during 1990: virus isolations from mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 31: 623-627.
- Gubler D, Rosen L, 1979. Variation in susceptibility to oral infection with dengue viruses among geographic strains of *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg* 28: 1045-1052.
- Tardieux I, Poupel O, Lapchin L, Rodhain F, 1990. Variation among strains of *Aedes aegypti* in susceptibility to oral infection with dengue virus type 2. *Am J Trop Med Hyg* 43: 308-313.
- Tabachnick WJ, Powell JR, 1979. A world-wide survey of genetic variation in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Genet Res* 34: 215-229.
- Failloux AB, Vazeille M, Rodhain F, 2002. Geographic genetic variation in populations of dengue virus vector *Aedes aegypti*. *J Mol Evol* 55: 653-663.
- Wallis GP, Tabachnick WJ, Powell JR, 1983. Macrogeographic genetic variation in a human commensal *Aedes aegypti*, the yellow fever mosquito. *Genet Res* 41: 241-258.
- Hervy JP, 1977. Expérience de marquage-lâcher-recapture, portant sur *Aedes aegypti* Linné, en zone de savane soudanienne ouest africaine II. Relations entre habitat, morphologie et

- comportement. *Cah ORSTOM Entomol Méd Parasitol* 15: 365-372.
16. Paupy C, Vazeille-Falcoz M, Mousson L, Rodhain F, Failloux AB, 2000. *Aedes aegypti* in Tahiti and Moorea (French Polynesia): isoenzyme differentiation in the mosquito population according to human population density. *Am J Trop Med Hyg* 62: 217-224.
  17. Yeh FC, Boyle TJB, 1997. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian J Bot* 129: 157.
  18. Goudet J, 1995. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *J Hered* 86: 485-486.
  19. Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM, 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
  20. Excoffier L, Laval G, Schneider S, 2005. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1: 47-50.
  21. Raymond M, Rousset F, 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 86: 248-249.
  22. Weir BS, Cockerham CC, 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evol Int J Org Evol* 38: 1358-1370.
  23. Rousset F, Raymond M, 1995. Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics* 140: 1413-1419.
  24. Smouse PE, Long JL, Sokal RR, 1986. Multiple regression and correlation extensions of the Mantel test of Matrix correspondence. *Syst Zool* 35: 627-632.
  25. Leduc A, Drapeau P, Bergeron Y, Legendre P, 1992. Study of partial components of forest cover using partial Mantel tests and path analysis. *J Veg Sci* 3: 69-78.
  26. Holm S, 1979. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand J Stat* 6: 65-70.
  27. Ihaka R, Gentleman R, 1996. R: a language for data analysis and graphics. *J Comput Graph Stat* 5: 299-314.
  28. Felsenstein J, 1989. PHYLIP-phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics* 5: 164-166.
  29. Tabachnick WJ, Munstermann LE, Powell JR, 1979. Genetic distinctness of sympatric forms of *Aedes aegypti* in East Africa. *Evol Int J Org Evol* 33: 287-295.
  30. Tabachnick WJ, 1991. Evolutionary genetics and arthropod-borne disease: the yellow fever mosquito. *Am Entomol* 37: 14-24.
  31. Miller BR, Monath TP, Tabachnick WJ, Ezike VI, 1989. Epidemic yellow fever caused by an incompetent mosquito vector. *Trop Med Parasit* 40: 396-399.
  32. Petersen JL, 1977. Behavior differences in two subspecies of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) in East Africa. PhD thesis, University of Notre-Dame, IN.
  33. McDonald PT, 1977. Population characteristics of domestic *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in villages on the Kenya coast. I. Adult survivorship and population size. *J Med Entomol* 14: 42-48.
  34. Trpis M, Hausermann W, 1986. Dispersal and other population parameter of *Aedes aegypti* in an African village and their possible significance in epidemiology of vector-borne diseases. *Am J Trop Med Hyg* 60: 1263-1279.
  35. Reiter P, Amador MA, Anderson RA, Clark GG, 1995. Dispersal of *Aedes aegypti* in an urban area after blood feeding as demonstrated by rubidium-marked eggs. *Am J Trop Med Hyg* 52: 177-179.
  36. Paupy C, Chantha N, Reynes J-M, Failloux A-B, 2005. Factors influencing the population structure of *Aedes aegypti* from the main cities in Cambodia. *Heredity* 95: 144-147.
  37. Huber K, Loan LL, Hoang TH, Ravel S, Rodhain F, Failloux A-B, 2002. Genetic differentiation of the dengue vector, *Aedes aegypti* (Ho Chi Minh City, Vietnam) using microsatellite markers. *Mol Ecol* 11: 1629-1635.
  38. Apostol BL, Black WC IV, Reiter P, Miller BR, 1994. Use of randomly amplified DNA by polymerase chain reaction markers to estimate the number of *Aedes aegypti* families at oviposition sites in San Juan Puerto Rico. *Am J Trop Med Hyg* 51: 89-97.
  39. Huber K, Luu Le L, Tran Huu H, Tran Kahn T, Rodhain F, Failloux AB, 2002. Temporal genetic variation in *Aedes aegypti* populations in Ho Chi Minh City (Vietnam). *Heredity* 89: 7-14.
  40. Hansson B, Westerberg L, 2002. On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. *Mol Ecol* 11: 2467-2474.
  41. David P, 1998. Heterozygosity-fitness correlations: new perspectives on old problems. *Heredity* 80: 531-537.
  42. Gorrochotegui-Escalante N, Gomez-Machorro C, Lozano-Fuentes S, Fernandez-Salas I, De Lourdes Munoz M, Farfan-Ale JA, Garcia-Rejon J, Beaty BJ, Black WC IV, 2002. Breeding structure of *Aedes aegypti* populations in Mexico varies by region. *Am J Trop Med Hyg* 66: 213-222.
  43. Dujardin JP, 1998. Population genetics and the natural history of domestication in Triatominae. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93 (Suppl II): 34-36.
  44. Schofield CJ, Diotaiuti L, Dujardin JP, 1999. The process of domestication in Triatominae. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 375-378.
  45. Lanzaro GC, Zheng L, Toure YT, Traore SF, Kafatos FC, Vernick KD, 1995. Microsatellite DNA and isozyme variability in a West African population of *Anopheles gambiae*. *Inst Mol Biol* 4: 105-112.
  46. Costa-Ribeiro MCV, Lourenço-de-Oliveira R, Failloux AB, 2006. Higher genetic variation estimated by microsatellite compared to isoenzyme markers in *Aedes aegypti* from Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 917-921.

REVIEW

Open Access

# New data regarding distribution of cattle ticks in the south-western Indian Ocean islands

Frédéric Stachurski<sup>1,2,3\*</sup>, Pablo Tortosa<sup>4,5</sup>, Patrick Rahajarison<sup>3</sup>, Stéphanie Jacquet<sup>1,2</sup>, Amina Yssouf<sup>4</sup> and Karine Huber<sup>1,2</sup>

## Abstract

Recent studies have produced new insight into the origin and distribution of some cattle ticks in the south-western Indian Ocean islands. *Rhipicephalus appendiculatus*, introduced from Tanzania in 2002, is now well established on Grande Comore but has not yet reached the other islands of the archipelago (Mohéli, Anjouan and Mayotte). Only one of the two clades identified in Africa has settled so far. *Amblyomma variegatum*, which was not supposed to be able to persist in the Antananarivo region (1300 m) nor in other Malagasy regions of high altitude without regular introductions of ticks by infested cattle, is now endemic as a general rule up to 1600 m although other regions of lower altitude (1400 m) are still free of the tick. This species remains confined in a small area of the west coast on La Reunion Island. On the contrary, *Hyalomma dromedarii* could not settle on Madagascar where it was introduced in 2008 and *Rhipicephalus evertsi evertsi* is not yet present in Grande Comore despite regular introductions by infested cattle from Tanzania. A phylogeographic approach has been carried out at an intra-specific level for *A. variegatum*. This study has led to the identification of two main lineages, one covering all species distribution and one restricted to East Africa and the Indian Ocean area. These two lineages are in sympatry in Madagascar where a high genetic diversity has been described, whereas a lower genetic diversity is observed on other islands. These results seem to agree with the historical data concerning the introduction of the tick in the Indian Ocean area.

## Table of contents

1. Introduction
2. Successful ancient introductions
3. Failed recent tick introductions
4. Successful recent tick introductions
5. Alteration of tick distribution
6. Conclusions
7. Competing interests
8. Authors' contributions
9. Acknowledgements
10. References

## 1. Introduction

Islands of the south-western Indian Ocean (SWIO) did not host ruminants (cattle, sheep and goats, deer) before human settlement regardless whether they split from

Gondwana about 150 million years ago (Madagascar) or emerged de novo as volcanoes during the last 10 million years (Mauritius, Comoros, La Reunion). Cattle introduction occurred between the 1<sup>st</sup> and 5<sup>th</sup> centuries on Madagascar, in the 7<sup>th</sup> century on Comoros, and in the 17<sup>th</sup> century on the Mascarene archipelago (Mauritius, Rodrigues and La Reunion). Archaeological research carried out on Madagascar led to the discovery of cattle bones dated from the 5<sup>th</sup>-7<sup>th</sup> centuries, the shape of the investigated skulls suggesting that *Bos taurus* was present at that period [1]. Zebu (*Bos indicus*) might have been bred on this island since at least the 10<sup>th</sup> century; it is, however, not clear whether these introductions were of Indonesian, Indian or African origin [2]. On Mauritius, cattle were introduced at least from the middle of the 18<sup>th</sup> century for the needs of the sugarcane industry, the introduction of zebu from Madagascar being documented in the early 19<sup>th</sup> [3]. Malagasy zebu were also introduced in La Reunion during the 17<sup>th</sup> and 18<sup>th</sup> centuries and later crossbred with *Bos taurus* of European

\* Correspondence: frederic.stachurski@cirad.fr

<sup>1</sup>CIRAD, UMR CMAEE, F-34398 Montpellier, France

<sup>2</sup>INRA, UMR 1309 CMAEE, F-34398 Montpellier, France

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



origin. Altogether, the available data suggest that the introduction of cattle on the islands of the region occurred first in Madagascar (*Bos taurus* followed by *Bos indicus*) and Comoros, and then in the Mascarene archipelago from Madagascar (*Bos indicus*) and from Europe (*Bos Taurus*).

Consequently, all cattle ticks present on these islands were introduced with their hosts after human settlement. As a result, some of the tick species have probably been present for centuries while others were introduced more recently. Tick species distribution may subsequently vary and evolve in response to cattle breeding characteristics, cattle movements or climate change. The latest data regarding the presence and distribution of cattle ticks in SWIO islands are presented below.

## 2. Successful past introductions

Despite the probable repeated introduction of ticks associated with centuries of regular cattle importation in Madagascar, cattle ticks were not described on the island before 1899. At that time, the presence of *A. variegatum* was reported both in Madagascar [4] and Mauritius [5] while it was not reported on La Reunion until 1949 [5]. *Boophilus microplus*, first described under other names [4,6] at the beginning of the XX<sup>th</sup> century on Madagascar and other SWIO islands, is presently prevalent on all islands and in all environments. Regional cattle movements between East and Southern Africa and Madagascar lasted at least until the 1960s, causing a risk of introduction of new tick species (see below) and probably maintaining some level of gene flow between African and Malagasy tick populations. Cattle importation is still common in Grande Comore (see below) whereas no cattle have been introduced on La Reunion and Mauritius for decades, limiting the risk of tick species introduction. It is unclear whether these historical differences in cattle introduction resulted in the establishment of tick populations with different genetic and physiological characteristics. This has been recently studied for *A. variegatum* from different countries of SWIO in comparison with populations from Africa, where this species originates, and from the Caribbean islands, where it was introduced more than two centuries ago.

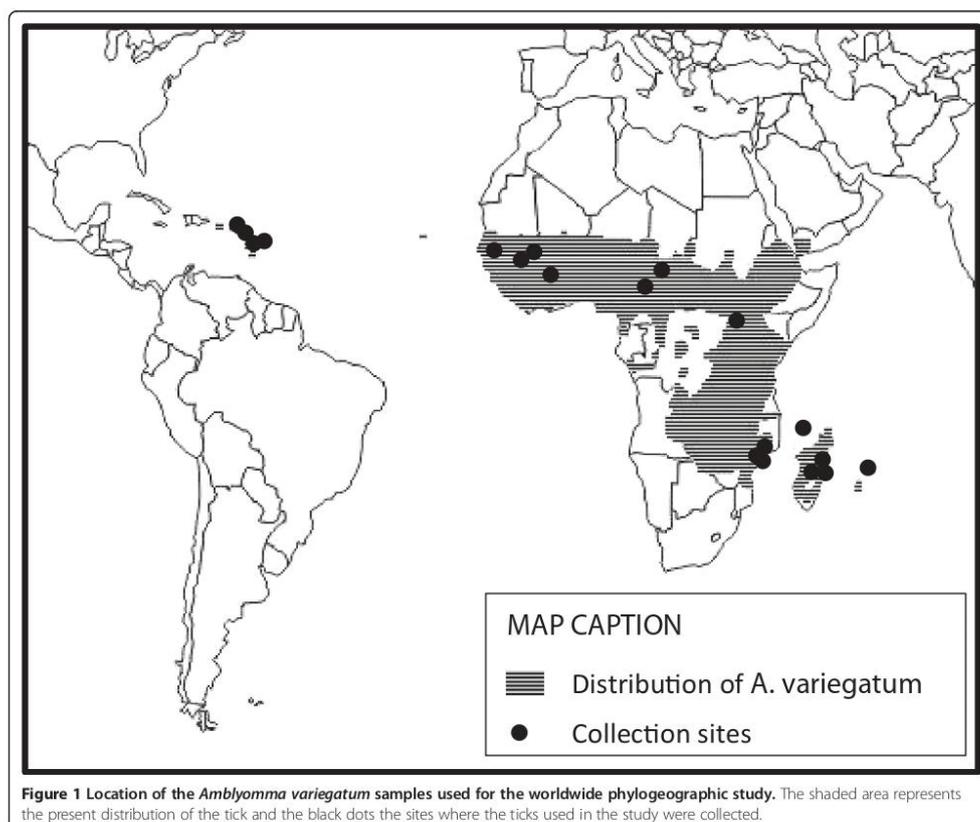
One phylogeographic study based on two mitochondrial markers (12SrDNA and D-Loop) suggested that *A. variegatum* is divided into two distinct groups, an East African group and a West African group including Caribbean tick populations [7]. Our studies were conducted at two different scales, one at the worldwide level (Figure 1) and the other one including only tick samples from the Indian Ocean area (Figure 2). Ticks were collected exclusively from domestic cattle and identified according to Walker et al. [8]. Eight ticks per site were randomly selected for mitochondrial analyses. After DNA extraction, a 408 bp fragment of the mtDNA 16S

ribosomal RNA and a 433 bp fragment of the mtDNA cytochrome b were amplified and sequenced. The worldwide study identified two major lineages, one covering the whole range of the species distribution while the other being restricted to East Africa and the Indian Ocean area (Huber, personal communication). Both large-scale studies hypothesize that *Amblyomma variegatum* originated from East Africa and diverged into two lineages along the Rift valley. The low level of genetic differentiation observed between East Africa and the Indian Ocean area suggests that *A. variegatum* was exported from East Africa to the SWIO islands. Such tick movements might actually still occur as there is currently cattle trade between East Africa and SWIO, anyway between Tanzania and Comoros islands.

At the local level, the two lineages are found in sympatry on Madagascar whereas the "worldwide" lineage is found quite exclusively on the other SWIO Islands (La Reunion, Mayotte and the Comoros Islands) (Jacquet, personal communication). A higher genetic variability (a high nucleotide and haplotypic diversity and a positive Tajima D value) is observed on Madagascar, indicating large, stable population sizes. Whereas cattle ticks were not described on Madagascar before 1899, the introduction of *A. variegatum* is probably much older and concomitant with the cattle introduction on this island (see above). This ancient introduction followed by several successive re-introductions could have led to this high genetic diversity. A similar situation has been shown for the *Aedes aegypti* mosquito in Madagascar [9]. Conversely, a reduced genetic variability is observed on the other islands. This can be caused by a more recent introduction of the cattle tick to these islands and by repeated genetic bottlenecks (low number of ticks introduced, less re-introductions or repeated acaricide treatments), leading to smaller population sizes more susceptible to genetic drift. On Madagascar, it has been observed that the "worldwide" lineage was present throughout the island whereas the "East African" lineage was only detected in the center and the eastern part of the island which are the areas of Madagascar with the highest rainfall (Jacquet, personal communication). It has been hypothesized that the "worldwide" lineage could have a greater ecological plasticity allowing it to thrive in more variable conditions. This could explain the predominance of ticks belonging to this lineage on other islands of the Indian Ocean.

## 3. Failed recent tick introductions

Uilenberg mentioned repeated episodes of tick introduction on Madagascar without successful colonisation [10]. The ticks were generally discovered during cattle inspection at the quarantine in Toamasina harbour (east coast) on animals imported from South Africa: *Rhipicephalus appendiculatus* as well as other *Rhipicephalus* species,



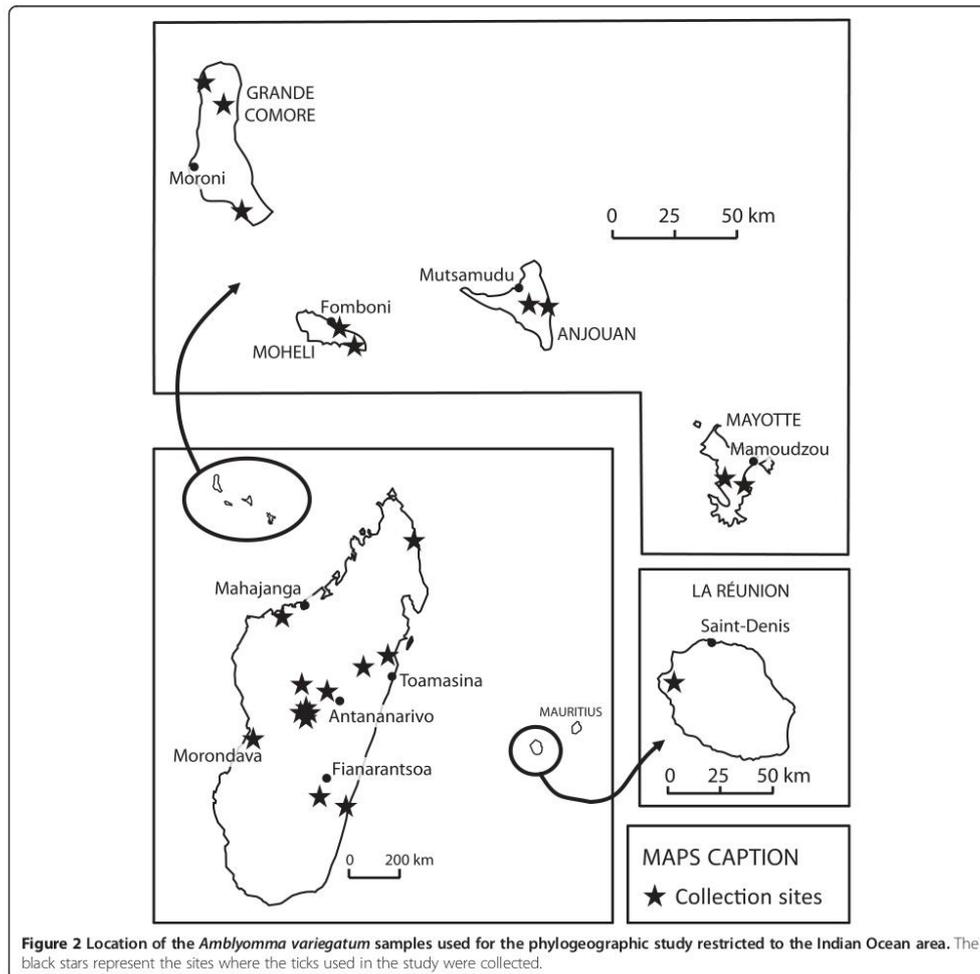
**Figure 1** Location of the *Amblyomma variegatum* samples used for the worldwide phylogeographic study. The shaded area represents the present distribution of the tick and the black dots the sites where the ticks used in the study were collected.

*Amblyomma hebraeum*, *Hyalomma marginatum rufipes* and *Hyalomma truncatum* were thus observed in these circumstances. Uilenberg also reported that goats were moved in 1963 from the harbour to a locality in the south of Madagascar where they were found infested by *H. truncatum* and *Rhipicephalus evertsi evertsi*. It seemed, however, that these species could not settle in spite of an apparently suitable climate.

Recently, five dromedaries were offered to Madagascar by the head of state of Libya. They arrived at Antananarivo airport in January 2008 with certificates guarantying an acaricide treatment before exportation and were immediately moved to a governmental residence in the south of the capital. One month later, the veterinarian in charge of the dromedaries brought ticks to the Veterinary Research Department (DRZV) of the National Centre of Applied Research for Rural Development (FOFIFA) where they were identified as *Hyalomma dromedarii* males. Two weeks later, the dromedaries were examined again by

acarologists and found to be still infested by 40 male ticks. It is likely that, soon after their arrival in Madagascar, the female ticks had all engorged and dropped off in the pasture and premises where the animals were kept, in the vicinity of a dairy farm. However, four years later, no *H. dromedarii* had been reported either on the cows or on the dromedaries, which were in the meantime moved to the Antananarivo zoological gardens. It can thus be assumed that the local humid climate (more than 1200 mm of annual rainfall) and/or some other factors make the local environment unsuitable for this Sahelian tick.

In 2010, *R. e. evertsi* was found on cattle imported from Tanzania to Comoros, while it was absent on local cattle [11]. This suggests that this species either could not adapt to the local environmental conditions or that it was on its way to colonise Grande Comore. A proper tick survey on Comoros is necessary to check whether this species will succeed in colonising the archipelago.



#### 4. Successful recent tick introductions

*Rhipicephalus appendiculatus*, a species of high veterinary importance in East Africa, was observed for the first time in Mauritius in 1980 although probably introduced from South Africa some 20 years earlier [5]. More recently, this species was introduced on Grande Comore through cattle importation from Tanzania in 2002, leading to numerous mortalities due to East Coast Fever (ECF) during the following months [12]. Interestingly, the origin of cattle importation to Comoros has switched from Madagascar to Tanzania following a free trade bill signed in 2000. This switch was associated with the emergence of

several epidemics (ECF, Chikungunya, Rift Valley Fever - RVF - and Dengue), some of which spread to other islands of the region (Chikungunya and RVF). This is a documented episode emphasizing the importance of trade-associated cattle movements in the emergence of zoonosis [11-15].

A survey was carried out in January and February 2010 on 34 sites distributed over 16 of the 17 districts of Comoros. Five animals were randomly selected on each site and visually examined. All ticks were sampled in low infested animals, and up to 150 ticks on heavily infested animals. Ticks were found on 23 of the inspected sites,

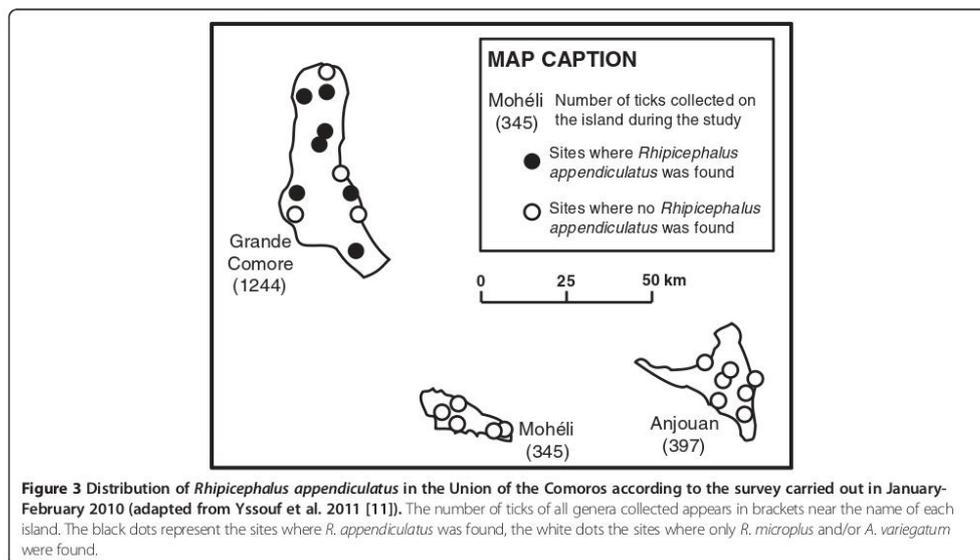
distributed on the 3 islands. The collected ticks were identified morphologically with the help of the key provided by Walker et al. [8]. This study showed that *R. appendiculatus* had established throughout Grande Comore. It was, however, absent from the two other Comorian Islands: Anjouan and Mohéli (Figure 3). The species was also absent from the French administrated neighbouring Island of Mayotte. This limited distribution was in accordance with the absence of ECF in Mohéli, Anjouan and Mayotte [11]. The inter-island livestock movements can explain this tick distribution since most cattle move from Tanzania, Mohéli or Anjouan towards Grande Comore, where important cattle slaughtering occurs during traditional weddings called "grands mariages". Illegal livestock transport to Mayotte (located 70 km south of Anjouan) occurs essentially from Anjouan and not from the other islands of the Union of the Comoros and concerns mainly goats. A phylogenetical analysis of *R. appendiculatus* showed that two clearly distinct clades were sampled on cattle imported from Tanzania while only one of them was found on locally reared cattle, suggesting that one group is perhaps more adapted to the locally encountered environment. It is noteworthy that, the successful *R. appendiculatus* clade was reported to be more competent for *Theileria parva* transmission, causing ECF, than the other unsuccessful clade [11]. Data summarised above confirm that the islands of the region are subjected to repeated tick introductions, but for various reasons only some of the tick species or sub-species succeed in colonising new areas and establishing self-

sustained populations. This suggests that dispersion capacities of ticks are actually high, but that local environmental conditions play a major role in limiting tick distribution [6].

As stated above, *R. appendiculatus* is present on Mauritius but not *Theileria parva*, the pathogen responsible for ECF. In 1980, the tick was observed only on two farms located on the south of the island. In 2009, a *R. appendiculatus* male was collected in a cattle farm in the north of the country (Grande Daube), highlighting the need for a proper survey of tick distribution on the island. Since the vector seems to have been established on that island, introduction of animals coming from Comoros should be as restricted and controlled as that from the African mainland. Madagascar used to export cattle to Comoros until 2000 but the reverse seemingly never occurs, at least officially. Whatever the case, this recent settlement and the consecutive mortalities, which are going on 10 years later, should prompt the veterinary authorities of all the islands of the region to strictly control animal movements and use adequate quarantine containment facilities when cattle introductions are required or decided [6].

### 5. Alteration of tick distribution

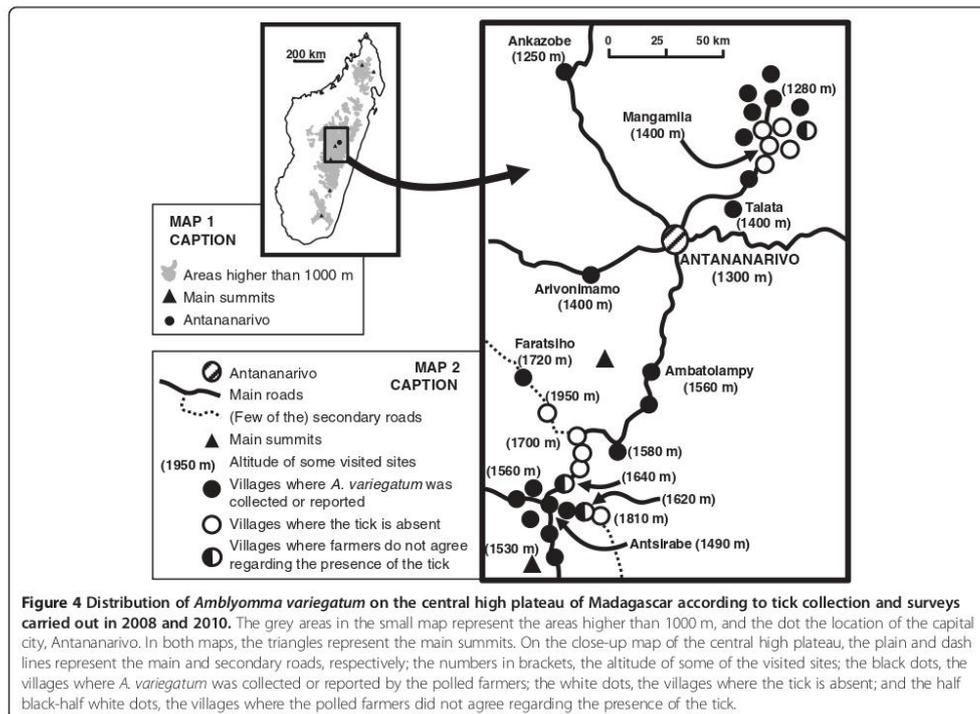
On La Reunion, *A. variegatum* seems to becoming scarce. Barré and Morel found it from Saint-Denis (north) to l'Etang Salé (south-west) up to 300 m altitude [5]. In 2001, a survey confirmed its presence on the island but with a distribution restricted to the western



portion of the previous distribution area. However, some specimens were collected at 900 m altitude. In 2009–2010, cattle and goats on 22 farms of the west coast were examined and *A. variegatum* were observed at only 2 sites, La Saline and Saint-Leu, where only 59 ticks were collected on the 70 examined cattle, all being “Moka”, i.e. Malagasy zebus or crossbred with that breed (Grimaud, personal communication). On Mauritius, similar changes did not occur. The tick is still present throughout the island, although mainly on lowland pastures, parasitizing cattle and deer as previously observed [5].

In Madagascar, Uilenberg et al. mentioned that « in Antananarivo area (1100 to 1400 m), *A. variegatum* is not rare during the rainy season, along the trails followed by the herds coming from the western regions and walking towards the abattoirs of the capital. The tick is absent or rare where these herds are not passing through, and it is uncertain that it can persist in Antananarivo region without continuous introduction from the western provinces » [4]. In 2008, tick collections were done in various villages of the high plateau. It was determined that the tick was unknown in the Mangamila area (1400 m) but more or less abundant in Ankazobe

(1250 m), Arivonimamo (1400 m) and Talata (1400 m) (Figure 4). In 2010, a survey was carried out on 80 villages of the Mangamila area, 70 km north from Antananarivo, and in the Antsirabe area. Discussions were organised in each village with farmers to whom the two cattle ticks of Madagascar (*B. microplus* and *A. variegatum*), kept in alcohol, were shown. People were asked whether they knew these ticks and whether they were infesting cattle of the village. According to the answer, more details were asked for, such as the date of the first observed infestation, the seasonality of the infestation, the presence of the ticks in the neighbouring villages or areas... *B. microplus* was known by all farmers. As far as *A. variegatum* is concerned, three answers were obtained: “the tick is present here”; “the tick is not here but we know it and have seen it in other villages/cattle markets”; “we never saw this tick”. Only on a few occasions, in some places at the limit between tick-free and tick-infested areas, farmers did not agree regarding the presence of *A. variegatum* (Figure 4). It appeared that the Mangamila area (about 200 km<sup>2</sup>) remains free of *A. variegatum* although the tick has infested some villages at the border of the free area for sometimes 20–40 years. It is not clear why the tick has



not yet settled in the free area despite regular movement of infested animals coming from endemic villages. Climate and vegetation of both (infested and free) areas are similar and a field experiment revealed that at least three free stages of the tick (unfed and engorged nymphs, unfed adults) could overwinter (Stachurski and Rahajison, personal communication). The low ruminant density, the absence of pasture sharing between tick-free and tick-infested villages, the stated acaricide treatment of all introduced animals could maintain such a tick-free situation, although an infestation is clearly to be feared in the future.

The distribution area has extended to the Ambatolampy and Antsirabe areas (central high plateau) where *A. variegatum* is now present in villages below 1600 m, and perhaps up to 1700 m in some isolated places like Faratsiho (Figure 4). There are, however, still some tick-free pockets, in the highest and therefore coldest areas. As the Antsirabe area is the dairy production zone of Madagascar, where exotic cattle (pure or crossbred of Friesian or red and white Norwegian) are reared, important losses due to cowdriosis are a clear threat. Some field veterinarians have already reported cowdriosis although this was never confirmed in the laboratory.

The presence of *A. variegatum* up to 1600 m on Madagascar and on the Adamawa highland of Cameroon [16] is an indication that the absence of the tick in high pastures of La Reunion is probably not due to the inability of the species to survive in such conditions. Very regular tick control, good monitoring of cattle movements between farms, lack of trade between the "Moka" herds and the other livestock (Friesian, Limousin) may be sufficient to limit the distribution of this tick on that island.

## 6. Conclusions

Data analysis demonstrates that the degree of success of tick colonisation of new areas depends on a range of factors (e.g. environmental, climatic, anthropic and genetic). Recent observations regarding cattle tick distribution in SWIO show that, despite the fact that some tick species have been established on islands for centuries, alterations in their distribution continue to occur mainly associated with host movements and/or climate change. A new vector species (*R. appendiculatus*) was recently introduced to Grande Comore and may potentially settle on the neighbouring islands, where it could lead to significant losses. As far as *A. variegatum* is concerned, the recent extension of its distribution in Madagascar could also lead to major losses due to cowdriosis or dermatophilosis in areas where dairy cattle of European breeds are reared. Several apparent failures in establishment of new tick populations were also reported: only one of the two *A. variegatum* lineages has a wide distribution in the region; only one of the two *R. appendiculatus* clades settled at present on

Grande Comore; *R. e. evertsi* has not succeeded to settle on Madagascar or Comoros despite several introductions. Yet, this apparent inability of certain tick species or subspecies to colonise additional islands or particular environments should not cause postponement in the establishment and strict enforcement of safety measures against introduction of new tick species and their associated tick-borne pathogens to the SWIO islands.

## 7. Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## 8. Authors' contributions

FS, PT and KH wrote the manuscript. FS and PR collected the data and the ticks in Madagascar. PT and AY carried out the work on *R. appendiculatus* in Comoros. KH and SJ did the analysis regarding *A. variegatum* phylogeographic. All authors read and approved the final version.

## 9. Acknowledgements

This work was supported by GIS-CRVOI (projet DIGEERAV-OI), by INRA AIP Bio-Ressources 2008, by CIRAD-INRA, by the Fonds Européen de Développement Régional, Programme Opérationnel de Coopération Territoriale Réunion, Pathogènes Associés à la Faune Sauvage Océan Indien #31189, and by the Service de Coopération et d'Action Culturelle of the French Embassy in Madagascar. For *A. variegatum* collections, we are indebted to H. Adakal, R. Pegram, M. Frebling, M. Asnaoui, M. Saimo, A. Boulanger, N. Cangi, S. Girard, Y. Grimaud, and M.R. Jaumally. For technical help to M. Dupraz, R. Aprelon and R. Rivallan. And to T. De Meeus for help regarding phylogeographic analyses.

## Author details

<sup>1</sup>CIRAD, UMR CMAEE, F-34398 Montpellier, France. <sup>2</sup>INRA, UMR 1309 CMAEE, F-34398 Montpellier, France. <sup>3</sup>FOFIFA-DRZV, BP 4, Antananarivo, Madagascar. <sup>4</sup>CRVOI, F-97490 Sainte Clotilde, La Réunion, France. <sup>5</sup>Université de La Réunion, 97490 Ste Clotilde, La Réunion, France.

Received: 8 October 2012 Accepted: 1 August 2013

Published: 9 September 2013

## 10. References

1. Andrianaivoarivony R: L'alimentation carnée chez les anciens malgaches. *Nouv Centre Art Archéo* 1987, **5**:6:22-26 (in French).
2. Meyer C: *Dictionnaire des Sciences Animales*. [http://dico-sciences-animales.cirad.fr]
3. Robequain C: Destin d'une île à sucre : l'économie et le peuplement de Maurice. *Ann geogr* 1954, **63**:255-273 (in French).
4. Uilenberg G, Hoogstraal H, Klein JM: Les tiques (Ixodoidea) de Madagascar et leur rôle vecteur. *Arch Inst Pasteur Madagascar* 1979, **NS**:1-153 (in French).
5. Barré N, Morel PC: Ticks (Acarina, Ixodoidea) of the Mascarene Islands (Indian Ocean) and diseases transmitted by them. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 1983, **36**:371-377 (in French).
6. Barré N, Uilenberg G: Propagation de parasites transportés avec leurs hôtes : cas exemplaires de deux espèces de tiques du bétail. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 2010, **29**:135-147 (in French).
7. Beati L, Patel J, Lucas-Williams H, Adakal H, Kanduma EG, Tembo-Mwase E, Krecsek R, Mertins JW, Alfred JT, Kelly S, Kelly P: Phylogeography and demographic history of *Amblyomma variegatum* (Fabricius) (Acari: Ixodidae), the tropical bont tick. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2012, **12**:514-525.
8. Walker AR, Bouattour A, Carnicas J, Estrada-Peña A, Horak IG, Latif AA, Pegram RG, Preston PM: *Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species*. Edinburgh: BioScience Reports; 2003.
9. Delatte H, Bagny L, Brengue C, Bouetard A, Paupy C, Fontenille D: The invaders: phylogeography of dengue and chikungunya viruses *Aedes* vectors, on the South West islands of the Indian Ocean. *Infect Genet Evol* 2011, **11**:1769-1781.
10. Uilenberg G: Notes sur les hématozoaires et tiques des animaux domestiques à Madagascar. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 1964, **17**:337-359 (in French).

11. Yssouf A, Lagadec E, Bakari A, Foray C, Stachurski F, Cardinale E, Plantard O, Tortosa P: **Colonization of Grande Comore Island by a lineage of *Rhipicephalus appendiculatus* ticks.** *Parasit Vectors* 2011, **4**:38.
12. De Deken R, Martin V, Saïdo A, Madder M, Brandt JRA, Geysen DM: **An outbreak of East Coast Fever on the Comoros: a consequence of the import of immunised cattle from Tanzania?** *Vet Parasitol* 2007, **143**:245–253.
13. Andriamandimby SF, Randrianarivo-Solofoniaina AE, Jeanmaire EM, Ravalolomanana L, Razafimanantsoa LT, Rakotojoelinandrasana T, Razainirina J, Hoffmann J, Ravalohery JP, Rafisandratantsoa JT, Rollin PE, Reynes JM: **Rift Valley fever during rainy seasons, Madagascar, 2008 and 2009.** *Emerg Infect Dis* 2010, **16**:963–970.
14. Carroll SA, Reynes JM, Khristova ML, Andriamandimby SF, Rollin PE, Nichol ST: **Genetic evidence for Rift Valley fever outbreaks in Madagascar resulting from virus introductions from the East African mainland rather than enzootic maintenance.** *J Virol* 2011, **85**:6162–6167.
15. Tortosa P, Pascalis H, Guernier V, Cardinale E, Le Corre M, Goodman SM, Dellagi K: **Deciphering arboviral emergence within insular ecosystems.** *Infect Genet Evol* 2012, **12**:1333–1339.
16. Stachurski F, Musonge EN, Achu-Kwi MD, Saliki JT: **Impact of natural infestation of *Amblyomma variegatum* on the liveweight gain of male Gudali cattle in Adamawa (Cameroon).** *Vet Parasitol* 1993, **49**:299–311.

doi:10.1186/1297-9716-44-79

Cite this article as: Stachurski *et al.*: New data regarding distribution of cattle ticks in the south-western Indian Ocean islands. *Veterinary Research* 2013 **44**:79.

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](http://www.biomedcentral.com/submit)



## Colonization of the Mediterranean basin by the vector biting midge species *Culicoides imicola*: an old story

S. JACQUET,<sup>1,2,3,4</sup> C. GARROS,<sup>1,2</sup> E. LOMBAERT,<sup>5</sup> C. WALTON,<sup>6</sup> J. RESTREPO,<sup>1,2</sup>  
 X. ALLENE,<sup>1,2</sup>† T. BALDET,<sup>1,2</sup>† C. CETRE-SOSSAH,<sup>1,2,7</sup>† A. CHASKOPOULOU,<sup>8</sup>†  
 J.-C. DELECOLLE,<sup>9</sup>† A. DESVARS,<sup>10</sup>† M. DJERBAL,<sup>11</sup>† M. FALL,<sup>12</sup>† L. GARDES,<sup>1,2</sup>†  
 M. DE GARINE-WICHATITSKY,<sup>13,14,15</sup>† M. GOFFREDO,<sup>16</sup>† Y. GOTTLIEB,<sup>17</sup>†  
 A. GUEYE FALL,<sup>12</sup>† M. KASINA,<sup>18</sup>† K. LABUSCHAGNE,<sup>19</sup>† Y. LHOR,<sup>20</sup>† J. LUCIENTES,<sup>21</sup>†  
 T. MARTIN,<sup>22,23</sup>† B. MATHIEU,<sup>9,24</sup>† M. MIRANDA,<sup>25</sup>† N. PAGES,<sup>2,26,27</sup>† I. PEREIRA DA  
 FONSECA,<sup>28</sup>† D. W. RAMILO,<sup>28</sup>† A. SEGARD,<sup>29,30</sup>† M.-L. SETIER-RIO,<sup>2,4</sup>† F. STACHURSKI,<sup>1,2</sup>†  
 A. TABBABI,<sup>31</sup>† M. TALLA SECK,<sup>12</sup>† G. VENTER,<sup>19</sup>† M. ZIMBA,<sup>1,5</sup>† T. BALENGHIEN,<sup>1,2</sup>  
 H. GUIZ,<sup>1,2</sup> C. CHEVILLON,<sup>3,4</sup> J. BOUYER<sup>1,2,12</sup> and K. HUBER<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>CIRAD UMR15 CMAEE, 34398 Montpellier, France, <sup>2</sup>INRA UMR1309 CMAEE, 34398, Montpellier, France, <sup>3</sup>CNRS, UMR 5290 Maladies Infectieuses & Vecteurs-Ecologie, Génétique, Ecologie, Contrôle (MIVEGEC), Université de Montpellier, Montpellier, France, <sup>4</sup>IRD, UR 224 MIVEGEC, BP 64501, Agropolis, 34394 Montpellier Cedex 5, France, <sup>5</sup>INRA, UMR1355, Institut Sophia Agrobiotech, 06903 Sophia Antipolis, France, <sup>6</sup>Computational and Evolutionary Biology, Faculty of Life Sciences, University of Manchester, Manchester, UK, <sup>7</sup>Plateforme de recherche CYROI, CRVOI, Sainte Clotilde, La Réunion, France, <sup>8</sup>USDA-ARS European Biological Control Laboratory, 54623 Thessaloniki, Greece, <sup>9</sup>Medicine Faculty, Institute of Parasitology and Tropical Pathology (IPPTS), EA7292, 67000 Strasbourg, France, <sup>10</sup>Department of Clinical Microbiology, Umea University, Umea, Sweden, <sup>11</sup>Regional Veterinary Laboratory of Draa-Ben-Kheda, Tizi-Ouzou, Algeria, <sup>12</sup>ISRA-LNERV, BP 2057 Dakar, Senegal, <sup>13</sup>Cirad, UPR AGIRs, RP-PCP, Harare, Zimbabwe, <sup>14</sup>Cirad, UPR AGIRs, Montpellier, France, <sup>15</sup>Department of Biological Sciences, Entomology, University of Zimbabwe, PO Box MP 167, Mount Pleasant, Harare, Zimbabwe, <sup>16</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise 'G. Caporale', 64100 Teramo, Italy, <sup>17</sup>Koret School of Veterinary Medicine, The Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food and Environment, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel, <sup>18</sup>Kenya Agricultural and Livestock Research Organization Sericulture, PO Box 7816, Code 01000 Thika, Kenya, <sup>19</sup>Agricultural Research Council-Onderstepoort Veterinary Institute, Parasites, Vectors and Vector-borne Diseases, Onderstepoort 0110, South Africa, <sup>20</sup>Office National de Sécurité Sanitaire des produits Alimentaires (ONSSA), Rabat, Morocco, <sup>21</sup>Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain, <sup>22</sup>UR Hortsys, Cirad, Montpellier, France, <sup>23</sup>Plant Health Department, ICIPE, Nairobi, Kenya, <sup>24</sup>EID Méditerranée, 34184 Montpellier, France, <sup>25</sup>Laboratory of Zoology, University of Balearics (UIB), Palma de Mallorca, Spain, <sup>26</sup>Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), UAB-IRTA, Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Spain, <sup>27</sup>CIRAD, UMR CMAEE, 97170 Petit Bourg, Guadeloupe, France, <sup>28</sup>Faculdade de Medicina Veterinária, CIISA, ULisboa, 1300-477 Lisboa, Portugal, <sup>29</sup>CNRS, UMR 5175 CEFE, Université de Montpellier, Montpellier, France, <sup>30</sup>EPHE Campus CNRS, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France, <sup>31</sup>Lab of Medical Parasitology, Biotechnologies & Biomolecules (LR 11 IPT 06), Pasteur Institute of Tunis, Tunis, Tunisia

### Abstract

Understanding the demographic history and genetic make-up of colonizing species is critical for inferring population sources and colonization routes. This is of main interest for designing accurate control measures in areas newly colonized by vector species of economically important pathogens. The biting midge *Culicoides imicola* is a major vector of orbiviruses to livestock. Historically, the distribution of this species was limited to the Afrotropical region. Entomological surveys first revealed the presence of *C. imicola* in the south of the Mediterranean basin by the 1970s. Following recurrent reports of massive bluetongue outbreaks since the 1990s, the presence of the species

Correspondence: Stéphanie Jacquet, Fax: +33 467 614 140; E-mail: stephanie.jacquet@cirad.fr

†By alphabetical order. These authors contributed to the work by collecting and/or identifying *C. imicola* samples, and commenting final manuscript.

© 2015 John Wiley & Sons Ltd

was confirmed in northern areas. In this study, we addressed the chronology and processes of *C. imicola* colonization in the Mediterranean basin. We characterized the genetic structure of its populations across Mediterranean and African regions using both mitochondrial and nuclear markers, and combined phylogeographical analyses with population genetics and approximate Bayesian computation. We found a west/east genetic differentiation between populations, occurring both within Africa and within the Mediterranean basin. We demonstrated that three of these groups had experienced demographic expansions in the Pleistocene, probably because of climate changes during this period. Finally, we showed that *C. imicola* could have colonized the Mediterranean basin in the Late Pleistocene or Early Holocene through a single event of introduction; however, we cannot exclude the hypothesis involving two routes of colonization. Thus, the recent bluetongue outbreaks are not linked to *C. imicola* colonization event, but rather to biological changes in the vector or the virus.

**Keywords:** approximate Bayesian computation, colonization, *Culicoides imicola*, microsatellites, mitochondrial genes

Received 8 June 2015; revision received 6 October 2015; accepted 9 October 2015

## Introduction

Understanding the history of colonization processes through the identification of population sources and geographical pathways is critical for predicting future colonization events and implementing effective management measures (Simberloff *et al.* 2013). Historical and observational data for colonizing species are often sparse, incomplete and misleading, so acquiring knowledge on the colonization processes using exclusively direct observations is hazardous. The indirect approaches of population genetics and phylogeography can nevertheless overcome these limitations. The genetic variability of invading populations depends on the history of their population sources as well as on the historical and demographical features of introduction into new areas (Estoup & Guillemaud 2010). Indeed, during the colonization process, colonizing populations will encounter various and complex demographic events such as population size changes, vicariance events and admixture of differentiated populations that will leave a signature on their genetic composition. The study of genetic variation among and within populations can thus help unravel the evolutionary and demographical history of the studied species (Avice 2000).

An illustrative example in this context is the northward expansion of the African biting midge *Culicoides imicola* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) into the Mediterranean basin. Historically, *C. imicola* is an Afrotropical species, widespread in sub-Saharan Africa and the Middle East, and occasionally recorded in the Far East [i.e. India (Dyce & Wirth 1983); with putative records in Southern China (Yü 2005)]. Throughout its distribution, *C. imicola* is a well-known vector of eco-

nomically important livestock viruses such as bluetongue virus (BTV) and epizootic haemorrhagic disease virus affecting domestic and wild ruminants as well as transmitting African horse sickness virus to equids (Mellor *et al.* 2000). Recurrent reports of such viruses in Mediterranean areas in the 20th century resulted in the suspicion of *C. imicola*'s presence in the area (Purse *et al.* 2005; Mellor *et al.* 2008, 2009). There, the BTV was first reported in 1924 from Cyprus island which was until 1998 the only European country where it was endemic (Gambles 1949), while it was periodically observed in the southern part of the Iberian Peninsula (Mellor *et al.* 1983, 1985) and several Greek islands (Boorman & Wilkinson 1983; Boorman 1986). Entomological surveys lately confirmed the presence of *C. imicola* in Mediterranean areas. The presence of *C. imicola* in Morocco and Algeria was admitted by the 1970s (Bailey-Choumara & Kremer 1970). At that time, entomological surveys identified the northern distribution edge of *C. imicola* at the latitude 40°N (Mellor *et al.* 1983, 1985, 2000; Rawlings *et al.* 1998). Meanwhile, *C. imicola* populations were reported in Israel, western Turkey (Anatolia) and on several Greek islands (Lesbos, Rhodes and Chios) (Braverman & Galun 1973; Boorman & Wilkinson 1983; Boorman 1986). By contrast, entomological surveys suggested that *C. imicola* remained absent from mainland Greece until 1999 (at least) (Mellor & Wittmann 2002).

The epidemiology of bluetongue disease dramatically changed between 1998 and 2005 with records of massive outbreaks throughout the Mediterranean basin (Mellor & Wittmann 2002; Mellor *et al.* 2009). This reinforced the entomological surveillance, which in turn confirmed the presence of *C. imicola* in Tunisia (Chaker *et al.* 2005) and virtually all Mediterranean islands along

the northern Mediterranean seashore: Portugal (Capela *et al.* 2003), Spain (Catalonia) (Monteys & Saiz-Ardanaz 2003; Monteys *et al.* 2005), the Balearic Islands (Miranda *et al.* 2003), France (Corsica, Var Department) (Delécolle & De La Rocque 2002; Venail *et al.* 2012), Italy (Sardinia, Sicily, mainland Italy) (Goffredo *et al.* 2003, 2004) and mainland Greece (Patakakis 2004). As a result, the consensual hypothesis was a northward expansion of *C. imicola* in late 20th century. Modelling analyses confirmed that the global increase in temperature could have opened new suitable habitats to the vector species in the Mediterranean basin in the 20th century, allowing thus the settlement of new and abundant populations (Purse *et al.* 2005) followed by a subsequent increase of bluetongue transmission (Guis *et al.* 2012).

Three phylogeographical studies analysed the sequence polymorphism of the mitochondrial gene cytochrome oxidase I (COI) of *C. imicola* (Dallas *et al.* 2003; Nolan *et al.* 2008; Calvo *et al.* 2009). They all deduced that a matrilineal differentiation between western (Portugal, Spain, Corsica, Italy, Morocco, Algeria) and eastern (Greece, Turkey, Israel) Mediterranean populations exists (Dallas *et al.* 2003; Nolan *et al.* 2008; Calvo *et al.* 2009). The authors concluded (i) a northward range expansion of *C. imicola* from two or three genetically distinct sources, with North African populations representing the most likely source of the western Mediterranean populations; (ii) the occurrence of two independent routes of colonization under the assumption of a joined colonization of both the BTV and its vector (Dallas *et al.* 2003; Nolan *et al.* 2008); and (iii) a recent and rapid colonization process in Spain (Calvo *et al.* 2009). The described routes of colonization were as follows: the first started in North Africa to reach Italy, via Sicily and Corsica; the second connected Israel and Turkey to Greece and Bulgaria. However, these studies were based on the use of a single genetic marker, which limits the understanding of the evolutionary and demographic history. This was recently complemented by a genetic study that used ten microsatellite markers to characterize the genetic structure of nuclear polymorphism of *C. imicola* in the western Mediterranean basin (North Africa, Italy and France). This study revealed low levels of genetic variation among these populations, indicating that they either share a recent common origin or recurrently exchange genes (Mardulyn *et al.* 2013). Unlike previous studies, the authors indicated an ancient presence of *C. imicola* in Italy submitted to recurrent immigration from North Africa.

Interestingly, none of these studies addressed the issue of the history, population sources and routes of the colonization of the Mediterranean basin in relation to the native area of *C. imicola*. Moreover, they did not

fully characterize the timeline of *C. imicola* expansion; a point remaining intensively debated in the literature. We designed this study to precisely address these points. We thus included populations from both the native range and the Mediterranean basin in a multilocus study including maternally and biparentally inherited markers (i.e. two mitochondrial genes and nine microsatellite markers). More specifically, we depicted the geographical pattern of genetic variation of *C. imicola* in the Afrotropical region and in the Mediterranean basin by a phylogeographical approach. We then characterized the genetic structure using Bayesian clustering and traditional population genetics tools. We finally performed approximate Bayesian computation analyses (ABC) (Beaumont *et al.* 2002; Bertorelle *et al.* 2010) to retrace and date the colonization events.

## Materials and methods

### Sampling and PCR amplification

Insects were sampled at 27 sites throughout southern Europe and Africa (Table 1, Fig. 1 circle symbol), including 13 sites from the native range of this species (i.e. sub-Saharan Africa and Indian Ocean). In addition, previously published COI sequences from Turkey and the United Arab Emirates (Nolan *et al.* 2008) were added to the data set (Table 1, Fig. 1 triangular symbol). Adult midges were collected using black light suction traps placed near livestock or horses. Specimens were preserved in 70% ethanol and *C. imicola* individuals identified and sexed under a binocular microscope using the description references (Delécolle & De La Rocque 2002). Both male and female were used for genotyping and sequencing.

Genomic DNA was extracted from single midges using the NucleoSpin96 Tissue Kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany) according to the manufacturer's instructions, starting with an additional step where each individual midge was ground in 200 µL of 1X PBS buffer. Each collected individual (11–34 individuals per site) was genotyped at nine microsatellite markers previously developed for *C. imicola* (Mardulyn *et al.* 2013) (Table S1, Supporting information). Seven microsatellite loci (68, 12b, 31, 41b, 88b, 16, 88) were amplified by multiplex PCR with the Type-it-Microsatellites kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the protocol described in the manufacturer's manual and the annealing temperature given in Table S1 (Supporting information). Simplex PCR reactions were carried out for two microsatellite markers (3b, 35t), in 20 µL of 1X Qiagen® reaction buffer (Qiagen), 0.1 mM each dNTP, 0.2 µM of each primer and 0.6 U of Qiagen Polymerase Taq® and 5 ng/µL of genomic DNA. Standard conditions for PCR

**Table 1** Geographical location of *C. imicola* sampled sites, number of individuals typed for microsatellite analyses (Nmic), number mitochondrial sequences obtained (Nmit) data and sample grouping based on clustering analysis based on microsatellite (Mic) and mitochondrial (mtDNA) data

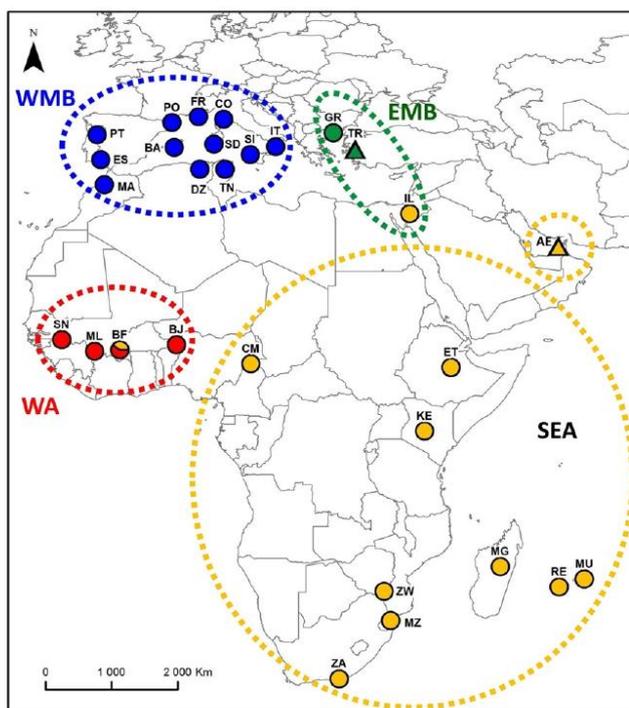
| Sampling location                               | Sampling year | Latitude | Longitude | Nmic | Nmit | Sample code | Cluster code (Mic) | Cluster code (mtDNA) |
|---|---------------|----------|-----------|------|------|-------------|--------------------|----------------------|
| Algeria   | 2003          | 36.8     | 8.5       | 32   | 9    | DZ          | WMB                | WMB                  |
| France-Corsica                                  | 2008          | 42.8     | 9.4       | 30   | 8    | CO          | WMB                | WMB                  |
| France-Pyrénées-Orientales                      | 2012          | 42.4     | 2.8       | 11   | 8    | PO          | WMB                | WMB                  |
| France-Var                                      | 2008          | 43.2     | 6.4       | 27   | 8    | FR          | WMB                | WMB                  |
| Italy-Calabria                                  | 2012          | 39.1     | 16.9      | 32   | 8    | IT          | WMB                | WMB                  |
| Italy-Sardinia                                  | 2012          | 39.1     | 8.5       | 32   | 8    | SD          | WMB                | WMB                  |
| Italy-Sicily                                    | 2012          | 38.0     | 12.6      | 31   | 8    | SI          | WMB                | WMB                  |
| Morocco   | 2004          | 34.4     | -6.4      | 32   | 8    | MA          | WMB                | WMB                  |
| Portugal  | 2010          | 39.9     | -7.4      | 31   | 8    | PT          | WMB                | WMB                  |
| Spain-Andalusia                                 | 2012          | 37.3     | -6.9      | 30   | 8    | ES          | WMB                | WMB                  |
| Spain-Balearic Islands                          | 2012          | 39.5     | 3.1       | 28   | 8    | BA          | WMB                | WMB                  |
| Tunisia   | 2013          | 36.0     | 10.0      | 0    | 5    | TN          | WMB                | WMB                  |
| Greece  | 2013          | 41.0     | 24.7      | 31   | 8    | GR          | EMB                | EMB                  |
| Turkey (Nolan <i>et al.</i> 2008)               | 2001          | 38.5     | 27.7      | 0    | 21   | TR          | EMB                | EMB                  |
| Israel  | 2010          | 29.9     | 35.1      | 31   | 8    | IL          | EMB                | SEA*                 |
| Benin   | 2009          | 11.9     | 3.4       | 29   | 8    | BJ          | CA                 | WA                   |
| Burkina Faso                                    | 2004          | 11.2     | -4.3      | 0    | 7    | BF          | CA                 | WA                   |
| Cameroon  | 2009          | 9.3      | 13.5      | 29   | 7    | CM          | CA                 | SEA                  |
| Mali  | 2010          | 11.0     | -6.6      | 23   | 7    | ML          | CA                 | WA                   |
| Senegal   | 2012          | 12.6     | -12.2     | 32   | 8    | SN          | CA                 | WA                   |
| Ethiopia  | 2004          | 8.8      | 40.7      | 32   | 6    | ET          | CA                 | SEA                  |
| Kenya   | 2013          | 0.1      | 37.1      | 19   | 7    | KE          | CA                 | SEA                  |
| Mozambique                                      | 2013          | -25.9    | 32.5      | 20   | 8    | MZ          | SA                 | SEA                  |
| South Africa                                    | 2013          | -33.9    | 25.5      | 20   | 8    | ZA          | SA                 | SEA                  |
| Zimbabwe  | 2013          | -21.9    | 31.6      | 30   | 8    | ZW          | SA                 | SEA                  |
| Madagascar                                      | 2012          | -18.5    | 47.4      | 23   | 7    | MG          | SA                 | SEA                  |
| Mauritius                                       | 2007          | -20.2    | 57.5      | 34   | 4    | MU          | SA                 | SEA                  |
| France-Réunion Island                           | 2005          | -21.3    | 55.4      | 32   | 6    | RE          | SA                 | SEA                  |
| United Arab Emirates (Nolan <i>et al.</i> 2008) | 2005          | 25.2     | 55.3      | 0    | 3    | AE          | SA                 | SEA                  |

Clusters, obtained with STRUCTURE for microsatellite and BAPS for mitochondrial data, are coded as follows: WMB, western Mediterranean Basin; EMB, eastern Mediterranean Basin; CA, central Africa; WA, western Africa; SA, southern Africa; SEA, southeastern Africa.

\*The Israeli population was grouped with the EMB cluster for all analyses.

amplification included an initial denaturation step of 95 °C for 5 min, 35 cycles of denaturation for 30 s at 95 °C, annealing for 1 min at variable temperature (Table S1, Supporting information) and elongation for 1 min at 72 °C, followed by a final elongation of 5 min at 72 °C. Fragments were separated on an Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer. Among the samples that were successfully genotyped, 201 randomly selected insects (4–9 insects per locality) were sequenced for a portion of the mitochondrial genes cytochrome oxidase subunit I (COI, ~474 bp) and cytochrome b (Cytb, ~633 bp) and the nuclear gene elongation factor alpha (Efa, ~555 bp). PCR fragments and sequences were obtained using, respectively, the primers C1J1718 (CCGGTAAAATATAAATATAAAGTT-

C) and C1N2191 (GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTC) (Simon *et al.* 1994), Cytb\_12329F (GCACCTTCTAA-TATTTCAATTTGGT) and Cytb\_13038R (CTGGAATAA-AATTATCTGGGTCTCC) and Efa\_F1 (CGCCAAGTACTACGTCACCA) and Efa\_R3 (GGAGCGAAGACAACA ACCAT) designed in this study. PCR amplification reactions for both mitochondrial genes were performed in a 20 µL total reaction volume containing 1X of Qiagen buffer (Qiagen), 2.5 mM each dNTP, 0.2 µM of each primer, 0.6 U of Qiagen Polymerase Taq<sup>®</sup> and 5 ng/µL of genomic DNA. A single denaturing step at 95 °C for 5 min was followed by five cycles (denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 45 °C (COI) or 60 °C (Cytb) for 40 s and elongation at 72 °C for 1 min), then 30 cycles (denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 51 °C for



**Fig. 1** Sampling locations for *C. imicola* specimens (see sample codes in Table 1) and genetic clustering of *C. imicola* sampled populations based on COI sequences. Genetic groups were assessed by the spatial group clustering method of Corander *et al.* (2008) implemented in BAPS v.6.0. Sample sites with the same color belong to the same cluster.

40 s and elongation at 72 °C for 1 min) and final extension at 72 °C for 8 min. For EF $\alpha$  gene, PCR amplification reactions were conducted in a 20  $\mu$ L total reaction volume containing 1X of Qiagen buffer (Qiagen), 2 mM of MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM each dNTP, 0.2  $\mu$ M of each primer, 0.8 U of Qiagen Polymerase Taq<sup>®</sup> and 5 ng/ $\mu$ L of genomic DNA. A single denaturing step at 95 °C for 5 min was followed by five cycles (denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 52 °C for 1 min and elongation at 72 °C for 1 min), then 35 cycles (denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 45 °C for 30 s and elongation at 72 °C for 1 min) and final extension at 72 °C for 8 min.

#### Sequence analyses

Sequences were aligned with the Clustal W algorithm (Thompson *et al.* 1994) available in the software GENIEIOUS v.6.0.5 (Biomatters, <http://www.geneious.com>).

The nuclear sequences of EF $\alpha$  gene obtained from 204 *C. imicola* individuals were not used for extensive analyses owing to a lack of polymorphism. The haplotype network and results of mismatch distributions and

Bayesian clustering analyses are presented as supplementary data (Fig. S1, Supporting information).

Twelve CytB sequences from eight sub-Saharan (Benin, Burkina Faso, Cameroon, Ethiopia, Mali, Mauritius, Mozambique and Réunion Island) and Israeli populations contained nucleotide uncertainties. We performed all analyses on both markers. For population structure inference (genetic differentiation and Bayesian clustering analyses), the results of CytB are not presented as they were less informative.

**Population structure.** Population structure was assessed with the Bayesian clustering of genotypes implemented in BAPS v.6.0 (Corander *et al.* 2008; Cheng *et al.* 2013). The analysis was conducted with a series of 50 replicates runs and a maximum number of populations (K) set to 13 (i.e. the number of presently sampled native sites). Given the limited number of samples in the eastern Mediterranean group and taking geographic locations into account, we grouped the Israeli population with those of the eastern Mediterranean basin cluster (see results) for further analyses. Genetic differentiation

between the clusters of sequences inferred by BAPS was tested with ARLEQUIN v.3.5.2 (Excoffier *et al.* 2005).

*Genetic diversity and genealogical relationships.* Genetic diversity within populations and clusters was evaluated by the haplotype number (H), haplotype diversity (Hd) and nucleotide diversity ( $\pi$ ) per site using DNASP v.5.10 (Librado & Rozas 2009). To infer genealogical relationships among populations, we constructed a median-joining network (Bandelt *et al.* 1999) for each gene with NETWORK v.4.6.1.2 (www.fluxus-engineering.com).

*Demographic history.* The genetic signature of past demographic changes within the inferred clusters was investigated from the COI and CytB concatenated data set. We performed neutrality tests based on Tajima's D and Fu's  $F_s$  statistics with DNASP v.5.10. Significant negative values (i.e. significant rejection of the null hypothesis) are expected in populations that had experienced an increase in effective population size (Tajima 1989; Fu 1997; Ramos-Onsins & Rozas 2002). We also computed a mismatch distribution test with ARLEQUIN v.3.5.2 (Excoffier *et al.* 2005). In populations that have undergone a rapid demographic expansion, the mismatch distribution is expected to have a smooth unimodal curve (Rogers & Harpending 1992). The time of expansion ( $t$ ) was then estimated using the equation  $t = \tau/2u$ , where  $\tau$  ( $\tau$ ) is estimated through the mismatch test and  $u = 2\mu k$ , with  $k$  describing the sequence length and  $\mu$  the mutation rate ranging from 0.0075 to 0.0211 substitutions/site/lineage/Myr (Papadopoulou *et al.* 2010). We further performed a Bayesian skyline analysis implemented in BEAST v.1.8 (Drummond *et al.* 2012) to quantify and date the changes in effective population size. The analysis was conducted under a random local molecular clock, the HKY+I substitution model and a mutation rate ranging uniformly from 0.0075 to 0.0211 substitutions/site/lineage/My. We ran 100 million generations sampled every 10 000 steps and used a burn-in of 10%. We used TRACER v.1.6 software to analyse the posterior distributions and plot the graph.

*Detection of adaptive selection.* Sites under positive or negative selection in COI and Cytb genes were inferred using the single-likelihood ancestor counting (SLAC), fixed-effects likelihood (FEL), and random-effects likelihood (REL) methods as implemented in DataMonkey server (<http://www.datamonkey.org>) (Pond & Frost 2005a,b; Murrell *et al.* 2012). Positive selection for a site was considered to be statistically significant if the  $P$  value was  $<0.1$  for the SLAC and FEL methods or the posterior probability was at the  $\geq 90\%$  level for the REL method. A mixed-effects model of evolution was further used to identify selected sites under conditions of episo-

dic diversifying selection. Selected sites with a  $P$  value  $< 0.05$  were reported.

#### Microsatellite analyses

*Population structure and genetic diversity.* Linkage disequilibrium between locus pairs was tested using FSTAT v2.9.3.2 (Goudet 1995). The same software was also used for performing the following standard genetic analyses. Within-samples departures from Hardy-Weinberg proportions and genetic differentiation among samples were assessed through the Weir & Cockerham (1984)'s unbiased estimates  $F_{ST}$  and  $F_{IS}$ . A significant deviation of  $F_{ST}$  from zero was tested using the exact G test over 10 000 permutations of genotypes among samples. Significant deviations of  $F_{IS}$  from zero were tested through 10 000 allelic permutations among the genotypes belonging to the same samples. The presence of null alleles was tested with the software MICRO-CHECKER v2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004). Within-samples estimates in genetic diversity were assessed by computing the allelic richness ( $A_r$ ) and the mean genetic diversity ( $H_s$ ) (Nei & Chesser 1983) with FSTAT v2.9.3.2. Observed heterozygosity and expected heterozygosity were computed for each population using the software ARLEQUIN v.3.5.2.

Population genetic structure was inferred using the Bayesian approach implemented in STRUCTURE v.2.3.3 (Pritchard *et al.* 2000) which assigns individuals to a defined number of genetic clusters according to their genotypes. We performed 10 independent runs for each value of  $K$  varying from 1 to 13 (i.e. the number of presently sampled native sites) under the admixture model and correlated alleles frequencies (Falush *et al.* 2003). We used the sampling locations as priors' information (Locprior model) to assist the clustering process. Each run consisted of a burn-in of 10 000 steps followed by a Monte Carlo Markov chain of 10 million iterations. The accurate number of clusters was inferred with the  $\Delta K$  method (Evanno *et al.* 2005). The same analysis was performed again within the inferred clusters to assess potential genetic substructure. In addition, because the model used by STRUCTURE assumes Hardy-Weinberg equilibrium for all loci, we performed the analyses for the complete data set, but also for the data set without the three loci for which Hardy-Weinberg equilibrium was significantly rejected across samples (35t, 16, 88). The figures were edited with DISTRUCT v.1.1 (<https://web.stanford.edu/group/rosenberglab/distruct.html>).

To visualize the genetic structure and relationships between sampled sites, we constructed a neighbour-joining (NJ) tree (Takezaki & Nei 1996) based on the pairwise genetic distances of Cavalli-Sforza & Edwards (1967) using the software POPULATIONS v.1.2.30

(<http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>). The robustness of nodes was evaluated by performing 1000 bootstrap replicates.

**Colonization scenarios inference.** Approximate Bayesian computation methods are model-based approaches allowing the inference of complex evolutionary scenarios using summary statistics to compare simulated and real data sets (Beaumont *et al.* 2002). We used DIYABC software v.2.0.4 (Cornuet *et al.* 2010, 2014) for inferring the possible routes of *C. imicola* colonization. We focused on the questions dealing with the origin and colonization routes towards the western and eastern Mediterranean basin. Table 2 presents the different tested scenarios. The possibilities of incomplete sampling and of genetic structuring within African clusters were taken into account by modelling unsampled populations as described by Lombaert *et al.* (2011). This implies that the colonized population originated from an unsampled population belonging to one African cluster.

The analyses were conducted on microsatellite data by choosing one representative sample displaying the lowest mean  $F_{ST}$  per cluster. We also tested the scenarios using the sequence data as well as the combined microsatellite and sequence data sets. However, these simulations never reached convergence for an accurate model comparison even when we fairly increased the number of iterations. We therefore used the microsatellite data only. Prior distributions of demographic, historical and mutational parameters are given in Table S2 (Supporting information). For scaling historical parameters, we assumed 10 generations per year (Braverman & Linley 1988) and a divergence time within the last 30 000 generations and starting 330 and 430 generations ago for the western and eastern cluster, respectively (first record of *C. imicola* in the Mediterranean basin; Bailly-Choumara & Kremer 1970; Szadziewski 1984). The average microsatellite mutation rate prior was set to range from  $6.10^{-6}$  to  $10^{-4}$  substitution per generation on a loguniform distribution.

All observed and simulated data sets were summarized with a set of statistics implemented in DIYABC including the mean number of alleles, the mean expected heterozygosity (Nei 1987), the mean allelic size variance, the Garza-Williamson's  $M$  (mean ratio of the number of alleles over the range of allele sizes; Garza & Williamson 2001), pairwise  $F_{ST}$  values (Weir & Cockerham 1984) and the classification index (mean individual assignment likelihood; Pascual *et al.* 2007). We generated 1 million simulated data sets per tested scenario. The posterior probabilities associated with each scenario were calculated by a polychotomous logistic regression (Cornuet *et al.* 2008) performed on the 1% of the simu-

lated data sets closest to the observed data set. The most probable scenario (with the highest probability) was selected.

As a first quality control of the analysis, we performed three replications of our ABC analysis using sample sites belonging to the same genetic unit as replicates of the same evolutionary history (Table S8, Supporting information). Second, we tested the robustness of the model divergence time by rerunning the model with different starting generation values (100 and 1000 generations).

Confidence in the selected scenario was evaluated by simulating 100 pseudo-observed data sets (pods) of each scenario using parameter values drawn from prior distributions (Table S2, Supporting information). Linear discriminant analysis transformed summary statistics were used to compute posterior probabilities used to calculate type I and II errors. The latter refer, respectively, to the probability of excluding the selected scenario when it is true and the probability of selecting the scenario when it is false. Mean type II error was calculated over all scenarios.

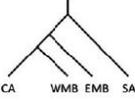
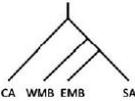
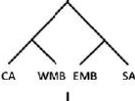
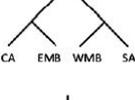
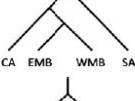
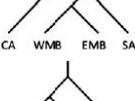
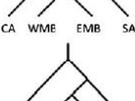
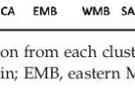
Finally, we assessed the goodness of fit of the selected scenario using the model checking option of DIYABC software (Cornuet *et al.* 2010). This allows evaluation of whether the selected scenario matches well with the observed genetic data set. If the selected scenario fits the observed data correctly, we expect data simulated under this model with parameters drawn from their posterior distribution to be close to the observed data. Our set of statistics included the summary statistics used for the model selection as well as the statistics that were not used for previous ABC treatment.

## Results

### Population structure and genetic diversity (microsatellite and mtDNA)

All pairs of loci were in linkage equilibrium among the 701 midges collected across the 25 sites (Tunisia and Burkina-Faso were not included due to their low sample sizes) and successfully genotyped at nine microsatellite loci. Significant departures from Hardy-Weinberg equilibrium were noticed in sub-Saharan populations, with  $F_{IS}$  ranging from 0.081 to 0.254 ( $P$ -value  $\leq 0.0002$ ) (Table S4, Supporting information). These high  $F_{IS}$  values are due to the presence of null alleles observed for three markers (35t, 16, 88) as revealed by the MICROCHECKER analysis; this is not surprising since the primers were designed from European populations (Mardulyn *et al.* 2013). The expected heterozygosity and observed heterozygosity for each

**Table 2** Description of the scenarios tested by approximate Bayesian computation analyses (ABC) on microsatellite data attempting to retrace the routes of colonization of *C. imicola* and confidence in scenario selection based on posterior probabilities, 95% confidence intervals and type I and II errors. Type I error is the probability of selecting another scenario when the chosen scenario is true. Type II error is the mean probability of selecting the chosen scenario when it is false. The selected (most probable) scenarios are highlighted in bold

| Scenarios | Description of tested scenarios  |   | Posterior Probability | 95% Credibility Interval | Type I Error | Type II Error |
|-----------|--|---|-----------------------|--------------------------|--------------|---------------|
| 1         | Introduction out from CA independently to WMB and EMB                    |    | 0.0494                | [0.0136, 0.0852]         |              |               |
| 2         | Introduction out from SA independently to WMB and EMB                    |    | 0.0026                | [0.0000, 0.0409]         |              |               |
| 3         | Introduction out from CA to WMB and from SA to EMB                       |    | 0.0096                | [0.0000, 0.0474]         |              |               |
| 4         | Introduction out from CA to EMB and from SA to WMB                       |    | 0.0039                | [0.0000, 0.0422]         |              |               |
| 5         | <b>Introduction out from CA to WMB then introduction from WMB to EMB</b> |  | 0.4269                | [0.3768, 0.4770]         | 0.64         | 0.07          |
| 6         | Introduction out from SA to WMB then introduction from WMB to EMB        |  | 0.0591                | [0.0242, 0.0941]         |              |               |
| 7         | <b>Introduction out from CA to EMB then introduction from EMB to WMB</b> |  | 0.4103                | [0.3645, 0.4562]         | 0.51         | 0.07          |
| 8         | Introduction out from SA to EMB then introduction from EMB to WMB        |  | 0.0381                | [0.0023, 0.0740]         |              |               |

ABC analyses were performed using one representative population from each cluster: Ethiopia, Zimbabwe, Morocco and Greece. Clusters are coded as follows: WMB, western Mediterranean Basin; EMB, eastern Mediterranean Basin; CA, central Africa; WA, western Africa; SA, southern Africa; SEA, southeastern Africa.

population are given in Table S4 (Supporting information).

We assessed the genetic structure of *C. imicola* both within its native range and within the presumably colonized area. The clustering analysis reveals a strong

geographical structure. The mitochondrial data from a 474-bp-length fragment of the COI mitochondrial gene obtained for 225 individuals showed four major clusters with BAPS v.6.0 (Corander *et al.* 2008; Cheng *et al.* 2013) clustering analysis. Two of these clusters discriminated

the western from the eastern Mediterranean populations (Greece and Turkey), defining thus the WMB and EMB clusters, respectively. The third cluster grouped the western African (WA) populations; the fourth and last southeastern African (SEA) cluster merged the samples from central, eastern and southern Africa, Indian Ocean and Middle East (Israel and United Arab Emirates) (Table 1, Fig. 1). The Bayesian clustering performed with STRUCTURE on microsatellite data was slightly different (Fig. 2). At a global scale,  $\Delta K$  was clearly maximum for  $K = 2$ , confirming the occurrence of genetic differentiation between the Mediterranean area and the native area of *C. imicola* (Fig. 2b). Within the Mediterranean group, the clustering analysis supports the occurrence of a genetic differentiation between western and eastern Mediterranean populations with  $K = 2$  (i.e. the EMB and WMB clusters previously defined; Table 1; Fig. 2b). As previously observed with mitochondrial data, the microsatellite polymorphism failed to detect genetic differentiation between North African and other western Mediterranean populations (Figs 1 and 2). The slight differences in the results obtained from nuclear and mitochondrial data concerned the native area of *C. imicola*. If microsatellite polymorphisms grouped the western African samples together, they were merged with central and eastern African ones within a central African (CA) cluster. This CA cluster was opposed to a southern African (SA) one grouping southern African and Indian Ocean samples. Interestingly, STRUCTURE analysis revealed admixture events or intermediate frequencies between these CA and SA clusters (Fig. 2b). Three of these four clusters (WMB, EMB and SA) are consistently retrieved in the STRUCTURE analysis at the global scale (for  $K = 4$ ; Fig. S2, Supporting information) and the NJ tree based on microsatellite markers (Fig. 3). Such support is not clearly shown for the CA cluster given the position of the Ethiopian and Kenyan samples in the NJ tree (Fig. 3). However, the microsatellite polymorphisms tended to group together the western African samples in the Bayesian clustering (for  $K = 4$ ; Fig. S2, Supporting information) and the NJ tree (Fig. 3). The defined genetic groups were also obtained with the data set analysed without the three markers exhibiting the presence of null alleles.

Despite the high geographical distances involved, pairwise  $F_{ST}$  estimates based on microsatellite data (Table 3, Table S5, Supporting information) remained relatively low within the WMB cluster ( $F_{ST} \leq 0.06$ ) as well as within and between CA and SA clusters ( $F_{ST} \leq 0.07$ ). By contrast, higher  $F_{ST}$  estimates ( $0.10 \leq F_{ST} \leq 0.24$ ) were recorded within the EMB cluster as well as when comparing any EMB sample with any WMB sample ( $F_{ST} = 0.12$ ). Such WMB-EMB genetic

differentiation was significantly nonnull ( $P < 0.05$ ). This differentiation pattern was also supported by COI sequences (details not shown).

We investigated the genetic diversity within populations. A higher genetic diversity of *C. imicola* was found in the native distribution area than in the Mediterranean basin. Indeed, using microsatellite polymorphism, we obtained an allelic richness ranging from 5.76 to 7.11 alleles per locus in the native area (i.e. CA and SA clusters), 3.43 to 4.43 in western Mediterranean basin and 3.80 to 3.93 in eastern Mediterranean basin (Table S4, Supporting information). The same signal was noticed for the genetic diversity that ranged from 0.67 to 0.77 in the native area (CA and SA) and from 0.57 to 0.64 in WMB, and was estimated to 0.49 in EMB (Table S4, Supporting information). Mitochondrial data displayed the same picture: 39 COI and 22 CytB haplotypes were discriminated among sub-Saharan African samples but only 13 COI and 20 CytB haplotypes among Mediterranean samples. Moreover, at both mitochondrial genes, the haplotype diversity and nucleotide diversity were higher in sub-Saharan Africa than in the Mediterranean basin (Table S3, Supporting information).

#### Genealogical relationships

A median-joining network based on COI sequences (Fig. 4) suggested strong relationships between EMB (Greece and Israel) and SEA (southeastern Africa). It also individualized WMB as a genetically distinct cluster sharing no COI haplotype with any of the three other clusters. The pattern of genetic variation within the western Mediterranean basin is characterized by the presence of two widespread dominant COI haplotypes (H39, H40) and few rare haplotypes. This gives thus a star-like shape to the network, i.e. a signature characteristic of populations that have undergone a demographic expansion. In contrast, the genetic variation in eastern Mediterranean basin is not consistent with recent expansion. The same pattern was observed with CytB sequences (Fig. S3, Supporting information).

#### Demographic history and detection of sites under selection

We explored demographic history across the genetic groups inferred by the clustering analysis. The neutrality and expansion tests based on mitochondrial genes (Table S6, Supporting information) suggest demographic expansion within the WMB and WA clusters, as indicated by the significantly negative values obtained for Fu's estimates. However, Tajima's  $D$  significantly rejected neutrality in the WMB cluster

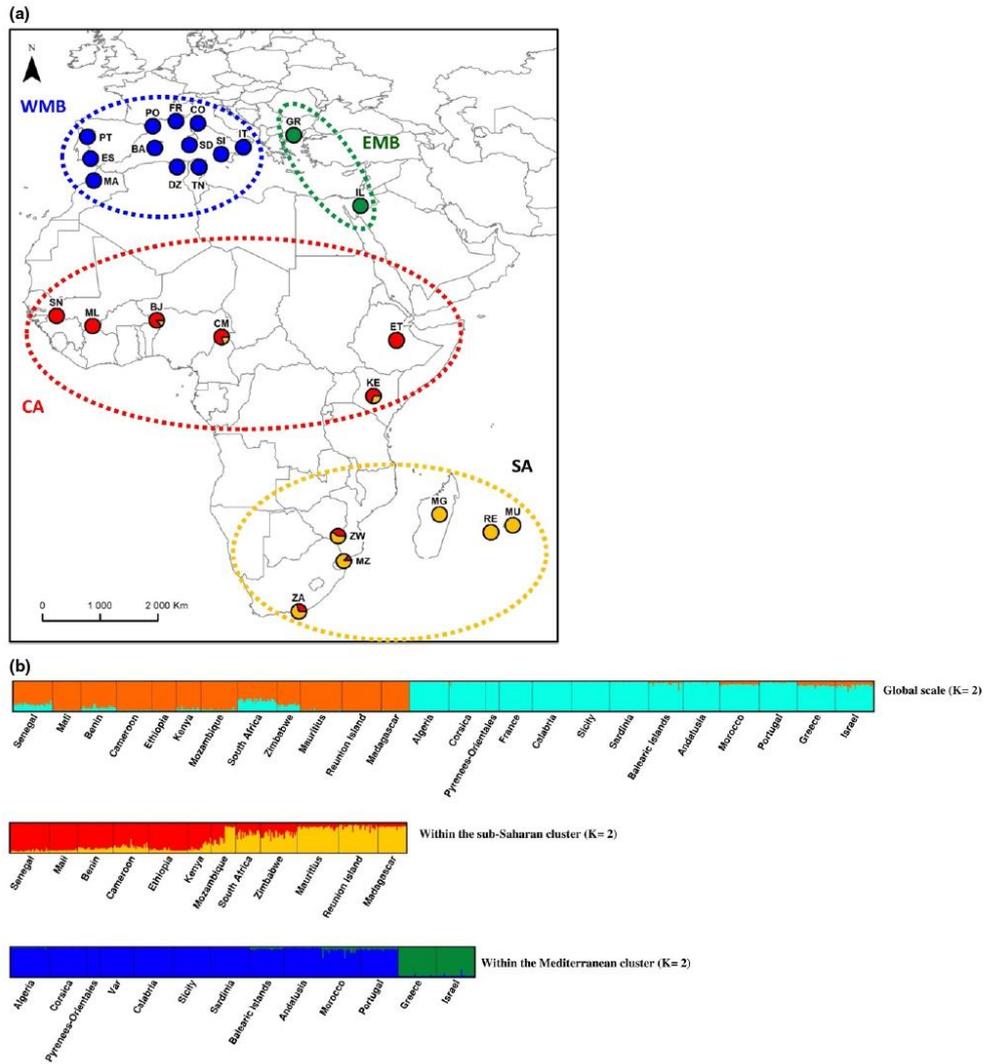
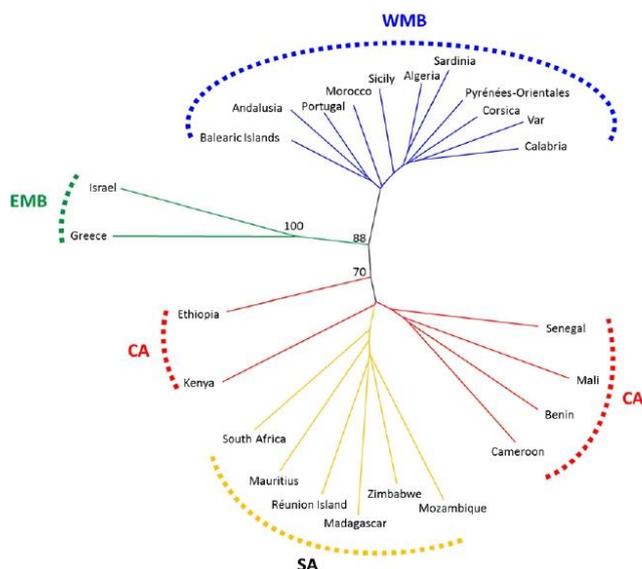


Fig. 2 Genetic clustering of *C. imicola* sampled populations. (a) Spatial Bayesian clustering based on microsatellite data. (b) Ancestry estimation assuming two population clusters at the global scale (upper part) and four population clusters at the genetic groups scale ( $K = 2$  within sub-Saharan Africa and Indian Ocean area (center part) and  $K = 2$  within the Mediterranean basin (lower part) based on the Bayesian clustering method implemented in STRUCTURE v.2.3.3. Each vertical line represents an individual, and each color represents a cluster. Individuals are grouped by sample site.

only ( $D = -1.972$ ,  $P$ -value  $< 0.05$ ), indicating thus either the effect of natural selection or past demographic expansion in the WMB ancestors. The Ramos-

Onsins & Rozas  $R_2$  and the raggedness  $r$  value were significant in WMB and WA, strengthening the hypothesis of past demographic expansions experi-



**Fig. 3** Neighbor-joining tree of *C. imicola* population samples based on the chord distance of Cavalli-Sforza & Edwards (1967) computed on microsatellite polymorphism. Central African populations are shown in red, southern African populations in yellow, eastern Mediterranean populations in green and western Mediterranean populations in blue. Bootstraps values were calculated over 1000 replicates and are represented as percentage. Only values >60% are reported.

**Table 3** Pairwise  $F_{ST}$  values across loci between the genetic clusters inferred by STRUCTURE v.2.3.3 of *C. imicola*. Population differentiation was assessed with the exact G test implemented in FSTAT v2.9.3.2. Significant values, at the adjusted nominal level (5%) for multiple comparison of 0.0083, are highlighted in bold

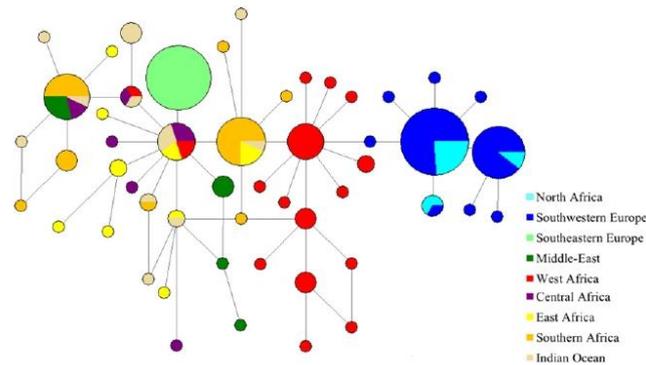
|                             | Southern Africa | Western Mediterranean Basin | Eastern Mediterranean Basin |
|-----------------------------|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Central Africa              | <b>0.0240</b>   | 0.0746                      | 0.1223                      |
| Southern Africa             | –               | <b>0.0891</b>               | <b>0.1593</b>               |
| Western Mediterranean Basin | –               | –                           | <b>0.1247</b>               |

enced by the western Mediterranean and western African populations. These results are also congruent with the mismatch distributions which are unimodal for WMB and WA clusters (Fig. 5). In contrast, the mismatch distributions in the SEA cluster are not clearly unimodal which can be due to a spatial heterogeneous grouping of multiple different haplotypes (given the large area included in the SEA cluster). However, the global shape of the mismatch distributions in the SEA cluster does not reject the hypothesis of past demographic expansion. Likewise, the Bayesian skyline plot (BSP) analysis indicated demographic expansion with an increase of the effective population size in the western Mediterranean

basin and sub-Saharan Africa during the last 17 000 and 80 000 years, respectively (Fig. 5). These dates are generally consistent with the time of demographic expansion driven from the value of tau ( $\tau$ ). Indeed, such values are estimated at 27 300–76 700 years ago for the western Mediterranean basin and at 61 100–190 000 years for sub-Saharan/Indian Ocean populations. By contrast, populations from the EMB cluster display a multimodal distribution. This indicates a demographic equilibrium along the last 90 000 years in the EMB cluster with nevertheless a slight signature of expansion *c.* 20 000 years ago.

None of the sites were detected as being under positive selection, and few sites (13 of 474 sites and 8 of 633 sites of COI and CytB genes, respectively) were under negative selection.

*Inference of historical colonization pathways.* We tested the colonization pathways of *C. imicola* out from sub-Saharan Africa into the Mediterranean basin. We used four analytic runs differing from one another by the samples chosen as representative of each cluster. All runs provided the same results (Table S8, Supporting information). The posterior probabilities calculated for each scenario provided higher statistical support to the scenarios #5 and #7 without being able to discriminate among these two. These scenarios assumed that the colonization of the Mediterranean basin by *C. imicola* had resulted from emigrants originating from the CA cluster. They differ from one another by the assumed order



**Fig. 4** Median-joining haplotype network of COI mitochondrial sequences of *C. imicola*. The size of the circles is proportional to the number of individuals with that haplotype. The length of the branches separating haplotypes is proportional to the number of mutational steps between them. Haplotype networks were constructed using NETWORK v.4.6.1.2. Colours represent the geographical region of sampled specimens. North Africa: Algeria, Morocco, Tunisia; Southwestern Europe: France-Corsica, France-Pyrénées Orientales, France-Var, Italy-Sardinia, Italy-Sicily, Italy-Calabria, Portugal, Spain-Andalusia, Spain-Balearic Islands, Southeastern Europe: Greece, Turkey; Middle East: Israel, United Arab Emirates; West Africa: Senegal, Benin, Mali, Burkina Faso; Central Africa: Cameroon, East Africa: Kenya, Ethiopia; Southern Africa: Mozambique, Zimbabwe, South Africa; Indian Ocean: Mauritius, Madagascar, France-Réunion Island.

of colonization between the western and eastern Mediterranean basin (Table 2). The scenario #5 assumed that the western Mediterranean basin was the first colonized area before acting as a population source for creating the EMB populations. The scenario #7 assumed the east Mediterranean basin to have been the first colonized area and EMB emigrants to have lately founded WMB.

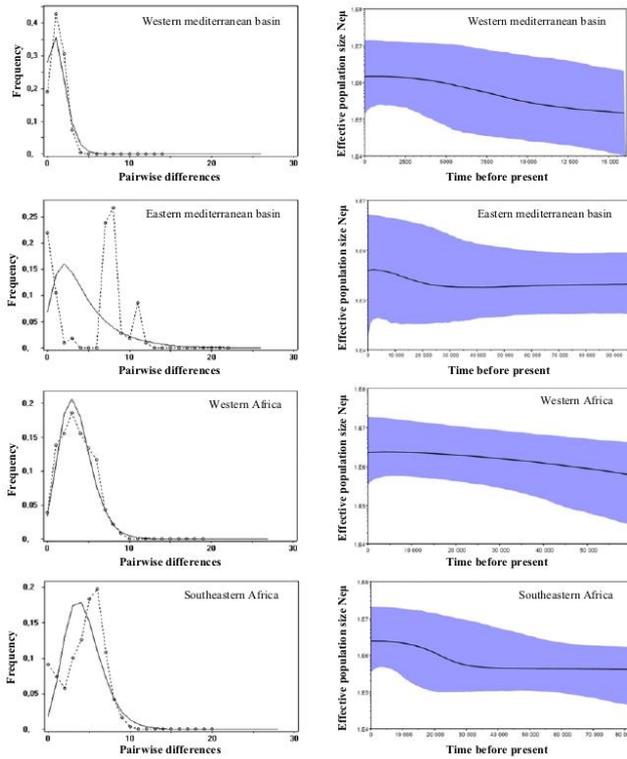
Running the ABC analysis with earlier and later values of starting generation for divergence time did not impact the results: scenarios #5 and #7 were also selected as best-fitting models ( $P = 0.32$  and  $0.29$ , for scenarios #5 and #7, respectively, using earlier values and  $P = 0.29$  and  $0.32$  for later values) which testify the robustness of the model.

We calculated type I and II errors in order to evaluate to what extent these scenarios could be trusted. We obtained type I error rate with a mean value of 0.64 for scenario #5 and 0.51 for scenario #7 (Table 2). These high values of type I error were mostly associated to scenario #7 when simulating scenario #5 and reciprocally. This may reflect that our data are not enough informative to discriminate between both scenarios using our ABC approach. Type II errors are relatively low with a mean value of 0.07 for both scenarios. Model checking was carried out for these two selected scenarios. None of the summary statistics (used and unused for ABC inferences) display low probability (i.e.  $P < 0.05$ ), indicating thus that both

scenarios fit well the real data set (Table S8, Supporting information). This was also confirmed by a principal component analysis (PCA): the PCA points simulated from the posterior distribution nicely grouped together and are relatively well centred on the target corresponding to the real data set (Fig. S4, Supporting information). Altogether, these results indicate that both scenarios #5 and #7 provide a satisfying description of our real data set.

## Discussion

ABC methods have been successfully used to infer colonization pathways of several invasive species (e.g. Miller *et al.* 2005; Pascual *et al.* 2007; Lombaert *et al.* 2011; Brouat *et al.* 2014). However, most of the studies focused on well-documented colonization for which the introduction dates and/or the colonists origin was already known (e.g. Miller *et al.* 2005; Guillemaud *et al.* 2010; Lombaert *et al.* 2010, 2011, 2014; Konecny *et al.* 2013). In our study case, the colonization process of the Mediterranean basin by *C. imicola* was unclear. The records of bluetongue outbreaks during the 1990s suggested the presence of *C. imicola* in the northern Mediterranean regions, which was subsequently confirmed by entomological surveys. However, neither these direct observations nor the genetic studies initially carried out (Dallas *et al.* 2003; Nolan *et al.* 2008; Mardulyn *et al.* 2013) provided information on the timing or



**Fig. 5** (a) Mismatch distribution among pairwise differences among haplotypes and (b) Bayesian skyline plot (BSP) based on COI and Cytb combined dataset in *C. imicola* different geographical groups. Mismatch analyses were conducted according to a growth-decline model. Observed data and theoretical expected distributions are represented by discontinuous and solid line, respectively. BSP were performed with a mutation rate of 0.0075–0.0115 substitutions/site/Myr and a random local molecular clock. The x-axis indicates times in years before present and the y-axis shows the effective population size. The black line represents the median population size and the grey outline indicated 95% posterior intervals for the population size change.

routes of colonization. In this current study, we addressed these issues over a large geographic area including the native and colonized range of *C. imicola*. Combining standard population genetics with ABC and phylogeographical analyses using both mitochondrial and nuclear markers allowed us to demonstrate (1) a major genetic structuring of *C. imicola* between its native area and Mediterranean populations, (2) a genetic structuring within the native range and (3) the previously reported west/east genetic subdivision among Mediterranean populations (Nolan *et al.* 2008). Altogether, these results shed a new light on the timing and routes of colonization of the Mediterranean basin by the bluetongue vector.

*Genetic structure of C. imicola within its native range.* Our study investigated the genetic structure of *C. imicola* within its native area. Maternally (mitochondrial) and biparentally (microsatellites) inherited markers congruently discovered a genetic substructure of *C. imicola* in

sub-Saharan Africa. Mitochondrial polymorphism clearly discriminated western African populations from all the others. Bayesian clustering analysis of nuclear polymorphism grouped the populations from southern Africa and the Indian Ocean together within the SA cluster. Such a cluster was differentiated from the central African cluster (CA) which groups all populations located at low latitudes in a west-to-east strip. The Bayesian analysis revealed the signature of admixture events that could have blurred an ancestral west/east differentiation. This west/east pattern of genetic differentiation could result from isolated populations deriving from the refuges opened in the glaciations of the Pleistocene. Climatic variations during this period have already been suggested to be a factor driving such pattern of differentiation in other African taxa including mammals (e.g. Lorenzen *et al.* 2012; Barlow *et al.* 2013; Barnett *et al.* 2014) and insects (e.g. Sezonlin *et al.* 2006). This hypothesis would also explain the observed signature of past demographic expansion of African

populations that we have dated between 60 000 and 200 000 years ago.

Alternatively, the observed genetic substructure could reflect a genetic differentiation of *C. imicola* populations derived from a widely distributed ancestral population, owing to limited gene flow due to geographical barriers such as desert, forest or water bodies. Thus, this would explain the highest genetic differentiation observed between the geographically most distant populations (West Africa and Indian Ocean). The apparent signature of admixture at the intermediate longitudes would be an artefact due to the inability of the STRUCTURE program to assign the individuals to one of the two clusters, and thus only reflects intermediate allele frequencies between central and southern Africa. This is in accordance with the obtained significant pattern of isolation by distance within sub-Saharan populations (data not shown), suggesting a stepping-stone model of migrations compatible with the high passive dispersal capacity through wind of *C. imicola*.

*Colonization history of the Mediterranean basin.* During the colonization process, complex demographic events may lead to complex genetic patterns in the colonized area (Estoup & Guillemaud 2010). Thus, inferring the history and routes of colonization of species may constitute a major challenge. In our case, the ABC analyses unambiguously identified the central Africa cluster as the source of the Mediterranean populations of *C. imicola*. More specifically, confidence analyses showed that the most probable scenarios involved a single introduction event of insects of central African origin into the Mediterranean basin and then a secondary colonization event of Mediterranean insects into new Mediterranean habitats. However, the ABC failed to discriminate the best scenario of this secondary event within the Mediterranean basin. The hypothesis of a unique event of colonization out from the native area is consistent with the microsatellite clustering analysis at the global scale suggesting two main clusters: one genetic cluster within the Mediterranean basin and one in sub-Saharan Africa. Within the Mediterranean basin, our results are congruent with those of previous studies through the support given to west/east genetic differentiation of *C. imicola* (Dallas *et al.* 2003; Nolan *et al.* 2008; Calvo *et al.* 2009). This subdivision is sharp in both microsatellite and mitochondrial data suggesting, under the hypothesis of equilibrium, a long-term isolation of these two genetic groups. Two hypothetical scenarios could explain such results: (1) a northward spread of *C. imicola* from sub-Saharan Africa to North African coast via the Sahara followed by an allopatric divergence within Mediterranean basin or (2) a colonization of eastern Mediterranean basin from colonists of sub-Saharan

African origin which passed by the Arabian Peninsula followed by subsequent spillover towards the western Mediterranean basin.

Based on mitochondrial data, the historical demographic analyses suggest the occurrence of demographic expansion in western Mediterranean populations between 27 000 and 77 000 years ago. By contrast, the eastern Mediterranean populations of *C. imicola* seemed to have remained demographically stable over the last 90 000 years, with a slight demographic expansion 20 000 years ago. Interestingly, these estimates overlap the wet phases of the Sahara desert during which it was vegetated, included permanent lakes and was probably occupied by humans and wild animals (Castaneda *et al.* 2009). These phases are considered as key periods for the migration of fauna, flora and human populations out of sub-Saharan Africa (Hooghiemstra *et al.* 1992; Osborne *et al.* 2008; Castaneda *et al.* 2009). Despite the fact that demographic analyses may be affected by the complex demographic events occurring during the colonization process, our results are consistent with an expansion of *C. imicola* distribution taking place during humidification of the Sahara in the Late Pleistocene and Holocene. These climate changes could have opened new suitable habitats to this species allowing its expansion towards the North African coast.

The clear west/east genetic structure observed in the Mediterranean basin has also been reported in many taxa (e.g. Horn *et al.* 2006; Arnaud-Haond *et al.* 2007; Kousteni *et al.* 2014). Hewitt (2000) suggested that during periods of glaciations, many animals and plants species have evolved into different genetic groups in the Mediterranean basin. Three main Mediterranean refuges have been described including the Iberian Peninsula, Italian Peninsula and the eastern Mediterranean basin (Balkan Peninsula, Middle East). Subsequent to the range expansion of *C. imicola* in the North African coast, a geographical isolation in western and eastern refuges during glacial Pleistocene periods could have created the current west/east differentiation pattern. This process is often associated with population contraction/expansion or range reduction (Hewitt 2001). Thus, the discrimination of a WMB cluster with low genetic diversity could result from a population contraction followed by an allopatric differentiation associated to a distinct glacial refuge. By contrast, the higher genetic diversity in eastern Mediterranean basin (EMB cluster) could either reflect a larger effective population size in this second Mediterranean refuge, or the recurrence of gene flows between native and the eastern Mediterranean populations. Alternatively, the presence of deserts in Egypt and Libya could have acted as a barrier to gene flows for *C. imicola*, thus maintaining

this west/east differentiation among *C. imicola* Mediterranean populations.

An alternative hypothesis would assume past *C. imicola* spread from sub-Saharan Africa to eastern Mediterranean basin via the Arabian Peninsula. This is supported by the close genealogical relationships observed from the mitochondrial haplotype network between the native populations and the eastern Mediterranean populations. The strong affinity with southeastern African populations likely reflects the involvement of a large founding effective population size consisting of widespread sub-Saharan haplotypes and/or a genetic connectivity with recurrent gene flow between these two areas. The latter hypothesis is consistent with observations of Persian air streams responsible of midges transport from the Arabian Peninsula to Israel (Braverman & Chechik 1996). Under that hypothesis, the western Mediterranean populations could have been colonized by migrants of east Mediterranean origin via a contact zone located in Egypt and/or Libya. If so, one would expect a gradient in genetic diversity along the Mediterranean coast (i.e. Middle East > northeastern Africa (Egypt/Libya) > northwestern Africa (Morocco/Algeria/Tunisia)) as well as shared haplotypes and/or admixture within the contact zone. Unfortunately, our sampling design is not accurate for testing such a hypothesis because of the paucity of samples collected in the Middle East and in northeastern Africa.

Discrepancies were observed between mitochondrial and microsatellite polymorphisms. The COI haplotype network indicated strong genealogical relationships between southeastern African and eastern Mediterranean populations as well as between West African and western Mediterranean populations suggesting two routes of introduction, while the microsatellites support a unique introduction event. Although we cannot exclude the hypothesis of two separate introductions into the Mediterranean basin, our results globally favoured a unique introduction event. Indeed, the Bayesian clustering results for both microsatellites and nuclear gene *EF $\alpha$*  support two major groups at the global scale, one in sub-Saharan Africa and one in the Mediterranean basin (Supplementary data), consistent with a single introduction event from sub-Saharan Africa into the Mediterranean basin. According to the haplotype network, eastern Mediterranean populations are genetically connected to one of the widespread haplotypes distributed throughout sub-Saharan Africa which includes samples that originated from West Africa. This pattern could result from an ongoing gene flow between Middle East and sub-Saharan Africa following the introduction, while western Mediterranean populations could have been more isolated and experienced a stronger genetic drift. It is worth noting that

there is a relative imbalance in the sampling effort between western and eastern Mediterranean regions owing to field accessibility issues. Incomplete sampling can induce genetic bias and lead to incorrect interpretations and conclusions (Muirhead *et al.* 2008). Therefore, a more extensive sampling within eastern Mediterranean and Middle East is needed to further uncover of the pattern of variation within and among populations as well as the connectivity between populations.

Discrepancies between mitochondrial and nuclear markers are likely to reflect their different sensitivities to demographic changes. Due to their maternal inheritance, the effective population size of mitochondrial genes is fourfold lower than that of nuclear autosomal genes (Birky *et al.* 1983). As a first consequence, mitochondrial markers are much more susceptible to stochastic processes such as genetic drift. In other words, they will tend to exhibit stronger differentiation patterns than nuclear genes over comparable evolutionary time scales (Hare 2001). As a second consequence, a longer coalescence time is observed for autosomal than for mitochondrial markers (Hare 2001).

It would also be interesting in a future study to include *C. imicola* samples from the Far East to investigate the genetic relationships between oriental, African and eastern Mediterranean populations. A recent study of the COI sequence variation included specimens from India and China. It showed that Far East populations shared COI haplotypes with South African and Israeli populations (Harrup, personal communication), supporting hence the hypothesis of a genetic connectivity among these areas. Interestingly, such connectivity was also supported by examining the variation in BTV serotypes (Maan *et al.* 2004; Nomikou *et al.* 2009).

*Colonization of southern Europe.* As in previous studies (Nolan *et al.* 2008; Mardulyn *et al.* 2013), our genetic data set indicated the North African populations of *C. imicola* as the most likely source of colonists for Europe. Moreover, our mitochondrial data set allowed dating of a demographic expansion in western Mediterranean basin during the last 17 000 years. Although we could not estimate the period of colonization of southwestern Europe, this present study suggests that *C. imicola* might have been present in some Mediterranean territories for a long time. Unlike the western group, the eastern Mediterranean basin displays a strong population genetic structure. These regions are highly mountainous so we could hypothesize geographical barriers to limit *C. imicola* long dispersal there.

The observed geographic subdivision of *C. imicola* populations within the Mediterranean basin matches well the genetic clusters previously described clusters

for BTV serotypes. Indeed, phylogenetic studies have identified BTV lineages belonging to either an 'eastern' source (BTV1, 9, 16) or to a 'western' source (BTV 2) (Purse *et al.* 2005; Nomikou *et al.* 2009). Moreover, two different strains of BTV serotype 4 have been shown to occur from northwest and east Africa (Nomikou *et al.* 2009). The genetic consistency regarding the genetic structure of *C. imicola* and BTV in the Mediterranean basin is likely to result from a similar demographic history involving similar environmental and/or geographical constraints. However, given the inferred timing of divergence between western Mediterranean and the native populations, *C. imicola* seems to have been established there long before the first report of BTV outbreaks (i.e. 1924 in Cyprus). In other words, other factors than the presence/absence of the vector have driven the spread of BTV in the Mediterranean basin (e.g. increases in vector abundance and/or vector competence, and a reduced extrinsic incubation period). Further studies should address these points.

### Conclusion

The current study illustrates how molecular data can provide insight into the evolutionary and historical processes underlying colonization. The use of genetic data indicated that *C. imicola* have expanded its distribution range out from the northern part of sub-Saharan Africa to the Mediterranean basin. Discrepancies between nuclear and mitochondrial markers suggest that the species populations could have colonized the Mediterranean basin through a single or two events of introduction. However, our results globally support a unique introduction. The estimated timescales of demographic expansion in Mediterranean populations highlight the potential role of Pleistocene and/or Early Holocene climate change in shaping the geographical distribution of this species and do not support the recent colonization of *C. imicola* of the Mediterranean basin. However, a precise divergence time between the sub-Saharan and Mediterranean populations would help to better understand the factors underlying the range expansion of *C. imicola* in the Mediterranean basin.

### Acknowledgements

We wish to express our sincere thanks to C. Coste and S. Falala (Cirad UMR15 CMAEE and INRA UMR1309 CMAEE in Montpellier), for computer support. We are grateful to R. Rivallan for genotyping assistance and M. Chapuis for advises on gene sequencing. This work was supported by the high performance cluster of the UMR AGAP Cirad. SJ was granted by the Chercheur d'Avenir 2011 call from the Languedoc-Roussillon region, France, Cirad and the Ministère de l'Agriculture.

This study was partially funded by EU grant FP7-613996 Vmerge and is catalogued by the VMERGE Steering Committee as Vmerge006 (<http://www.vmerge.eu>). The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission. MdGW and MZ were supported by the Ministère Français des Affaires Etrangères through the FSP-RenCaRe project within the framework of the Research Platform Production and Conservation in Partnership/RP-PCP.

### References

- Arnaud-Haond S, Migliaccio M, Diaz-Almela E *et al.* (2007) Vicariance patterns in the Mediterranean Sea: east-west cleavage and low dispersal in the endemic seagrass *Posidonia oceanica*. *Journal of Biogeography*, **34**, 963–976.
- Avice JC (2000) *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, UK.
- Bailly-Choumara H, Kremer M (1970) Epizooties de 1989, 1990 et 1991. Données épidémiologiques et stratégie de lutte. *Report of the Direction de l'Élevage. Ministère de l'Agriculture et de la Réforme Agraire, Rabat, Maroc*.
- Bandelt HJ, Forster P, Rohlf A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37–48.
- Barlow A, Baker K, Hendry CR *et al.* (2013) Phylogeography of the widespread African puff adder (*Bitis arietans*) reveals multiple Pleistocene refugia in southern Africa. *Molecular Ecology*, **22**, 1134–1157.
- Barnett R, Yamaguchi N, Shapiro B *et al.* (2014) Revealing the maternal demographic history of *Panthera leo* using ancient DNA and a spatially explicit genealogical analysis. *BMC Evolutionary Biology*, **14**, 70.
- Beaumont MA, Zhang W, Balding DJ (2002) Approximate Bayesian computation in population genetics. *Genetics*, **162**, 2025–2035.
- Bertorelle G, Benazzo A, Mona S (2010) ABC as a flexible framework to estimate demography over space and time: some cons, many pros. *Molecular Ecology*, **19**, 2609–2625.
- Birky CW, Maruyama T, Fuerst P (1983) An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. *Genetics*, **103**, 513–527.
- Boorman J (1986) Presence of bluetongue virus vectors on Rhodes. *Veterinary Record*, **118**, 21.
- Boorman J, Wilkinson P (1983) Potential vectors of bluetongue in Lesbos, Greece. *Veterinary Record*, **113**, 395–396.
- Braverman Y, Chechik F (1996) Air streams and the introduction of animal diseases borne on *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) into Israel. *Revue Scientifique et Technique*, **15**, 1037–1052.
- Braverman Y, Galun R (1973) The occurrence of *Culicoides* in Israel with reference to the incidence of bluetongue. *Refuah Veterinarith*, **30**, 121–127.
- Braverman Y, Linley J (1988) Parity and voltinism of several *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) in Israel, as determined by two trapping methods. *Journal of Medical Entomology*, **25**, 121–126.
- Brouat C, Tollenare C, Estoup A *et al.* (2014) Invasion genetics of a human commensal rodent: the black rat *Rattus rattus* in Madagascar. *Molecular Ecology*, **23**, 4153–4167.

- Calvo JH, Calvete C, Martínez-Royo A *et al.* (2009) Variations in the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene indicate northward expanding populations of *Culicoides imicola* in Spain. *Bulletin of Entomological Research*, **99**, 583–591.
- Capela R, Purse B, Pena I *et al.* (2003) Spatial distribution of *Culicoides* species in Portugal in relation to the transmission of African horse sickness and bluetongue viruses. *Medical and Veterinary Entomology*, **17**, 165–177.
- Castaneda IS, Muiltza S, Schefuss E *et al.* (2009) Wet phases in the Sahara/Sahel region and human migration patterns in North Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 20159–20163.
- Cavalli-Sforza LL, Edwards AW (1967) Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics*, **19**, 233–257.
- Chaker E, Sfari M, Rabhi M *et al.* (2005) Note faunistique sur les *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) du Gouvernorat de Monastir (Tunisie). *Parasite*, **12**, 359–361.
- Cheng L, Connor TR, Siren J, Aanensen DM, Corander J (2013) Hierarchical and spatially explicit clustering of DNA sequences with BAPS software. *Molecular Biology and Evolution*, **30**, 1224–1228.
- Corander J, Siren J, Arjas E (2008) Bayesian spatial modelling of genetic population structure. *Computational Statistics*, **23**, 111–129.
- Cornuet JM, Santos F, Beaumont MA *et al.* (2008) Inferring population history with DIYABC: a user-friendly approach to approximate Bayesian computation. *Bioinformatics*, **24**, 2713–2719.
- Cornuet JM, Ravigne V, Estoup A (2010) Inference on population history and model checking using DNA sequence and microsatellite data with the software DIYABC (v1.0). *BMC Bioinformatics*, **11**, 401.
- Cornuet JM, Pudlo P, Veyssier J *et al.* (2014) DIYABC v2.0: a software to make approximate Bayesian computation inferences about population history using single nucleotide polymorphism, DNA sequence and microsatellite data. *Bioinformatics*, **30**, 1187–1189.
- Dallas JF, Cruickshank RH, Linton YM *et al.* (2003) Phylogenetic status and matrilineal structure of the biting midge, *Culicoides imicola*, in Portugal, Rhodes and Israel. *Medical and Veterinary Entomology*, **17**, 379–387.
- Delécolle J-C, De La Rocque S (2002) Contribution à l'étude des *Culicoides* de Corse. Liste des espèces recensées en 2000/2001 et redescription du principal vecteur de la fièvre catarrhale ovine: *C. imicola* Kieffer, 1913 (Diptera, Ceratopogonidae). *Bulletin de la Société Entomologique de France*, **107**, 371–379.
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, **29**, 1969–1973.
- Dyce A, Wirth W (1983) Reappraisal of some Indian *Culicoides* species in the subgenus *Avaritia* (Diptera: Ceratopogonidae). *International Journal of Entomological*, **25**, 221–225.
- Estoup A, Guillemaud T (2010) Reconstructing routes of invasion using genetic data: why, how and so what? *Molecular Ecology*, **19**, 4113–4130.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14**, 2611–2620.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**, 47–50.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, **164**, 1567–1587.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, **147**, 915–925.
- Gambles RM (1949) Bluetongue of sheep in Cyprus. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, **59**, 176–190.
- Garza JC, Williamson EG (2001) Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology*, **10**, 305–318.
- Goffredo M, Conte A, Coccioletto R, Meiswinkel R (2003) The distribution and abundance of *Culicoides imicola* in Italy. *Veterinaria Italiana*, **47**, 22–32.
- Goffredo M, Conte A, Meiswinkel R (2004) Distribution and abundance of *Culicoides imicola*, *Obsoletus* complex and *Pulicaris* complex (Diptera: Ceratopogonidae) in Italy. *Veterinaria Italiana*, **40**, 270–273.
- Goudet J (1995) FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, **86**, 485–486.
- Guillemaud T, Beaumont MA, Ciosi M, Cornuet JM, Estoup A (2010) Inferring introduction routes of invasive species using approximate Bayesian computation on microsatellite data. *Heredity (Edinb)*, **104**, 88–99.
- Guis H, Caminade C, Calvete C *et al.* (2012) Modelling the effects of past and future climate on the risk of bluetongue emergence in Europe. *Journal of the Royal Society, Interface*, **9**, 339–350.
- Hare MP (2001) Prospects for nuclear gene phylogeography. *Trends in Ecology & Evolution*, **16**, 700–706.
- Hewitt G (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, **405**, 907–913.
- Hewitt GM (2001) Speciation, hybrid zones and phylogeography—or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology*, **10**, 537–549.
- Hooghiemstra H, Stalling H, Agwu COC, Dupont LM (1992) Vegetational and climatic changes at the northern fringe of the Sahara 250,000–5000 years BP: evidence from 4 marine pollen records located between Portugal and the Canary Islands. *Review of Palaeobotany and Palynology*, **74**, 1–53.
- Horn A, Roux-Morabito G, Lieutier F, Kerdelhue C (2006) Phylogeographic structure and past history of the circum-Mediterranean species *Tomiscus destruens* Woll. (Coleoptera: Scolytinae). *Molecular Ecology*, **15**, 1603–1615.
- Konecny A, Estoup A, Duplantier JM *et al.* (2013) Invasion genetics of the introduced black rat (*Rattus rattus*) in Senegal, West Africa. *Molecular Ecology*, **22**, 286–300.
- Kousteni V, Kasapidis P, Kotoulas G, Megalofonou P (2014) Strong population genetic structure and contrasting demographic histories for the small-spotted catshark (*Scyliorhinus canicula*) in the Mediterranean Sea. *Heredity*, **114**, 333–343.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**, 1451–1452.
- Lombaert E, Guillemaud T, Cornuet JM *et al.* (2010) Bridgehead effect in the worldwide invasion of the biocontrol harlequin ladybird. *PLoS ONE*, **5**, e9743.
- Lombaert E, Guillemaud T, Thomas CE *et al.* (2011) Inferring the origin of populations introduced from a genetically structured native range by approximate Bayesian computation: case study of the invasive ladybird. *Harmonia axyridis* *Molecular Ecology*, **20**, 4654–4670.

- Lombaert E, Guillemaud T, Lundgren J *et al.* (2014) Complementarity of statistical treatments to reconstruct worldwide routes of invasion: the case of the Asian ladybird. *Harmonia axyridis Molecular Ecology* **23**, 5979–5997.
- Lorenzen ED, Heller R, Siegmund HR (2012) Comparative phylogeography of African savannah ungulates. *Molecular Ecology*, **21**, 3656–3670.
- Maan S, Samuel A, Maan N *et al.* (2004) Molecular epidemiology of bluetongue viruses from disease outbreaks in the Mediterranean Basin. *Veterinaria Italiana*, **40**, 489–496.
- Mardulyn P, Goffredo M, Conte A *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. *Molecular Ecology*, **22**, 2456–2466.
- Mellor PS, Wittmann EJ (2002) Bluetongue virus in the Mediterranean Basin 1998–2001. *Veterinary Journal*, **164**, 20–37.
- Mellor PS, Boorman JPT, Wilkinson PJ, Martinezgomez F (1983) Potential vectors of bluetongue and African horse sickness viruses in Spain. *Veterinary Record*, **112**, 229–230.
- Mellor PS, Jennings DM, Wilkinson PJ, Boorman JP (1985) *Culicoides imicola*: a bluetongue virus vector in Spain and Portugal. *Veterinary Record*, **116**, 589–590.
- Mellor PS, Boorman J, Baylis M (2000) *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annual Review of Entomology*, **45**, 307–340.
- Mellor PS, Carpenter S, Harrup L, Baylis M, Mertens PP (2008) Bluetongue in Europe and the Mediterranean Basin: history of occurrence prior to 2006. *Preventive Veterinary Medicine*, **87**, 4–20.
- Mellor PS, Baylis M, Mertens PP (2009) *Bluetongue*. Elsevier Academic Press, London.
- Miller N, Estoup A, Toepfer S *et al.* (2005) Multiple transatlantic introductions of the western corn rootworm. *Science*, **310**, 992.
- Miranda MA, Borrás D, Rincon C, Alemany A (2003) Presence in the Balearic Islands (Spain) of the midges *Culicoides imicola* and *Culicoides obsoletus* group. *Medical and Veterinary Entomology*, **17**, 52–54.
- Monteys VSI, Saiz-Ardanaz M (2003) *Culicoides* midges in Catalonia (Spain), with special reference to likely bluetongue virus vectors. *Medical and Veterinary Entomology*, **17**, 288–293.
- Monteys VSI, Ventura D, Pages N, Aranda C, Escosa R (2005) Expansion of *Culicoides imicola*, the main bluetongue virus vector in Europe, into Catalonia, Spain. *Veterinary Record*, **156**, 415–417.
- Muirhead JR, Gray DK, Kelly DW *et al.* (2008) Identifying the source of species invasions: sampling intensity vs. genetic diversity. *Molecular Ecology*, **17**, 1020–1035.
- Murrell B, Wertheim JO, Moola S *et al.* (2012) Detecting individual sites subject to episodic diversifying selection. *PLoS Genetics*, **8**, e1002764.
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nei M, Chesser RK (1983) Estimation of fixation indexes and gene diversities. *Annals of Human Genetics*, **47**, 253–259.
- Nolan DV, Dallas JF, Pierrney SB, Mordue Luntz AJ (2008) Incursion and range expansion in the bluetongue vector *Culicoides imicola* in the Mediterranean basin: a phylogeographic analysis. *Medical and Veterinary Entomology*, **22**, 340–351.
- Nomikou K, Dovas CI, Maan S *et al.* (2009) Evolution and phylogenetic analysis of full-length VP3 genes of Eastern Mediterranean bluetongue virus isolates. *PLoS ONE*, **4**, e6437.
- Osborne AH, Vance D, Rohling EJ *et al.* (2008) A humid corridor across the Sahara for the migration of early modern humans out of Africa 120,000 years ago. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 16444–16447.
- Papadopoulou A, Anastasiou I, Vogler AP (2010) Revisiting the insect mitochondrial molecular clock: the mid-Aegean trench calibration. *Molecular Biology and Evolution*, **27**, 1659–1672.
- Pascual M, Chapuis MP, Mestres F *et al.* (2007) Introduction history of *Drosophila subobscura* in the New World: a microsatellite-based survey using ABC methods. *Molecular Ecology*, **16**, 3069–3083.
- Patakakis MJ (2004) *Culicoides imicola* in Greece. *Veterinaria Italiana*, **40**, 232–234.
- Pond SLK, Frost SD (2005a) Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics*, **21**, 2531–2533.
- Pond SLK, Frost SD (2005b) Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Molecular Biology and Evolution*, **22**, 1208–1222.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945–959.
- Purse BV, Mellor PS, Rogers DJ *et al.* (2005) Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nature Reviews Microbiology*, **3**, 171–181.
- Ramos-Onsins SE, Rozas J (2002) Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, **19**, 2092–2100.
- Rawlings P, Capela R, Pro MJ *et al.* (1998) The relationship between climate and the distribution of *Culicoides imicola* in Iberia. In: *African Horse Sickness* (eds Mellor P., Baylis M., Hamblin C., Mertens P. C., Calisher C.), pp. 93–102. Springer, Vienna.
- Rogers AR, Harpending H (1992) Population-growth makes waves in the distribution of pairwise genetic-differences. *Molecular Biology and Evolution*, **9**, 552–569.
- Sezonlin M, Dupas S, Le Rü B *et al.* (2006) Phylogeography and population genetics of the maize stalk borer *Busseola fusca* (Lepidoptera, Noctuidae) in sub-Saharan Africa. *Molecular Ecology*, **15**, 407–420.
- Simberloff D, Martin JL, Genovesi P *et al.* (2013) Impacts of biological invasions: what's what and the way forward. *Trends in Ecology & Evolution*, **28**, 58–66.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A *et al.* (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, **87**, 651–701.
- Szadziewski R (1984) Ceratopogonidae (Diptera) from Algeria. VI. *Culicoides* Latr. *Polskie Pismo Entomologiczne*, **54**, 163–182.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**, 585–595.
- Takezaki N, Nei M (1996) Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*, **144**, 389–399.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence

- alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673–4680.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 535–538.
- Venail R, Balenghien T, Guis H *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: *Arthropods as Vectors of Emerging Diseases* (ed. Mehlhorn H), pp. 77–102. Springer-Verlag, Berlin.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population-structure. *Evolution*, **38**, 1358–1370.
- Yü I (2005) *Cenatopogonidae of China: (Insecta: Diptera)*. Military Medical Science Press, Beijing, China.
- 
- S.J., C.G. and K.H. designed the study. S.J. and J.R. genotyped the samples. S.J., C.G., E.L. and K.H. analysed the data. X.A., T.B., C.C.S., A.C., J.-C.D., A.D., M.D., M.F., I.F., L.G., Md.G-W., M.G., Y.G., A.G.F., M.K., K.L., Y.L., J.L., T.M., B.M., M.M., N.P., D.R., A.S., M.-L.S.-R., F.S., M.T.S., G.V. and M.Z. collected and/or identified the *C. imicola* samples. C.W., T.B., H.G., C.C. and J.B. contributed to the manuscript firstly written by S.J., C.G. and K.H. All authors read and commented the final manuscript version.
- 
- Data accessibility**
- Nucleotide sequences of COI and CytB generated in this study were deposited in GenBank under Accession nos KT0264989–KT027189 and KT027190–KT027376, respectively. Microsatellite genotypes, COI alignment, CytB alignment, EFA alignment and Samples ID are available on Dryad doi:10.5061/dryad.1sm6c
- Supporting information**
- Additional supporting information may be found in the online version of this article.
- Table S1** Primers used for the amplification of the microsatellite loci in *C. imicola* (Mardulyn *et al.* 2013), allele size range observed in this study and annealing temperature (Ta) used for amplification.
- Table S2** Prior distributions of demographic, historical and mutation parameters used for ABC inferences.
- Table S3** Genetic diversity based on mitochondrial data for each sampled site and genetic cluster assessed by the spatial group clustering implemented in BAPS v.6.0.
- Table S4** Genetic diversity based on microsatellite data for each sampled site and genetic cluster assessed by STRUCTURE v.2.3.3.
- Table S5** Pairwise  $F_{ST}$  values between *C. imicola* populations samples (cf. Table 1 for codes) estimated with FSTAT v2.9.3.2.
- Table S6** Results of demographic analysis based on COI and CytB concatenated data set for each cluster.
- Table S7** Pairwise  $F_{ST}$  values based on COI mitochondrial gene between the genetic clusters inferred by BAPS v.6.0.
- Table S8** Description of the scenarios tested by approximate Bayesian computation analyses (ABC) on microsatellite data attempting to retrace the routes of colonization of *C. imicola* with different sets of sampled populations.
- Table S9** Approximate Bayesian computation model checking of the most probable scenario (Scenario 5 and 7) using all the summary statistics (used and unused for model selection).
- Fig. S1** Genetic clustering of *C. imicola* sampled populations (a), Efx median-joining haplotype network (b) and mismatch distribution among pairwise differences among haplotypes based on Efx sequences (c).
- Fig. S2** Ancestry estimation assuming three and four population clusters ( $K = 3$  and  $K = 4$ ) based on the Bayesian clustering method implemented in STRUCTURE v.2.3.3.
- Fig. S3** Median-joining haplotype network of a) Cytochrome b and b) COI and Cytochrome b concatenated sequences of *C. imicola*.
- Fig. S4** Principal component analysis summary statistics simulated under the most probable scenarios: Scenario 5 (atop) and 7 (bottom).

# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Range expansion of the Bluetongue vector, *Culicoides imicola*, in continental France likely due to rare wind-transport events

Received: 24 September 2015  
Accepted: 13 May 2016  
Published: 06 June 2016

Stéphanie Jacquet<sup>1,2,3</sup>, Karine Huber<sup>4</sup>, Nonito Pagès<sup>5,6</sup>, Sandra Talavera<sup>6</sup>, Laura E. Burgin<sup>7</sup>, Simon Carpenter<sup>8</sup>, Christopher Sanders<sup>8</sup>, Ahmadou H. Dicko<sup>9</sup>, Mouloud Djerbal<sup>10</sup>, Maria Goffredo<sup>11</sup>, Youssef Lhor<sup>12</sup>, Javier Lucientes<sup>13</sup>, Miguel A. Miranda-Chueca<sup>14</sup>, Isabel Pereira Da Fonseca<sup>15</sup>, David W. Ramilo<sup>15</sup>, Marie-Laure Setier-Rio<sup>16</sup>, Jérémy Bouyer<sup>1,17</sup>, Christine Chevillon<sup>2,3</sup>, Thomas Balenghien<sup>1</sup>, Hélène Guis<sup>1</sup> & Claire Garros<sup>1</sup>

The role of the northward expansion of *Culicoides imicola* Kieffer in recent and unprecedented outbreaks of *Culicoides*-borne arboviruses in southern Europe has been a significant point of contention. We combined entomological surveys, movement simulations of air-borne particles, and population genetics to reconstruct the chain of events that led to a newly colonized French area nestled at the northern foot of the Pyrenees. Simulating the movement of air-borne particles evidenced frequent wind-transport events allowing, within at most 36 hours, the immigration of midges from north-eastern Spain and Balearic Islands, and, as rare events, their immigration from Corsica. Completing the puzzle, population genetic analyses discriminated Corsica as the origin of the new population and identified two successive colonization events within west-Mediterranean basin. Our findings are of considerable importance when trying to understand the invasion of new territories by expanding species.

Rapid shifts in the geographic distribution of arthropod species, including incursion into new regions, can have major ecological and economic impacts<sup>1</sup>. Among vectors of human or livestock-associated arboviruses, the most high profile recent examples of this phenomenon have been among the Aedenine mosquitoes, particularly *Stegomyia albopicta* (= *Aedes albopictus*) (Skuse), *Hulecoeteomyia japonica* (= *Ae. japonicus*) (Theobald) and *Hu. koreica* (= *Ae. koreicus*) (Edwards)<sup>2–4</sup>. Several lifecycle characteristics of these species facilitate their

<sup>1</sup>Cirad, UMR15 CMAEE, 34398; INRA, UMR1309 CMAEE, 34398 Montpellier, France. <sup>2</sup>CNRS, Université de Montpellier, UMR 5290 Maladies Infectieuses & Vecteurs-Ecologie, Génétique, Ecologie, Contrôle (MIVEGEC), Montpellier, France. <sup>3</sup>IRD, UR 224 MIVEGEC, BP 64501, Agropolis, 34 394 Montpellier cedex 5, France. <sup>4</sup>INRA, UMR1309 CMAEE,34398; Cirad, UMR15 CMAEE, 34398 Montpellier, France. <sup>5</sup>Cirad, UMR15 CMAEE, 97170 Petit-Bourg, France; INRA, UMR1309 CMAEE 34398 Montpellier, France. <sup>6</sup>Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), UAB-IRTA, Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Spain. <sup>7</sup>Met Office, Exeter, UK. <sup>8</sup>Vector-borne Viral Diseases Programme, The Pirbright Institute, Pirbright, UK. <sup>9</sup>West African Science Service on Climate Change and Adapted Land Use, Climate Change Economics Research Program, Cheikh Anta Diop University, Sénégal. <sup>10</sup>Institut National de la Médecine Vétérinaire (IMV), Laboratoire vétérinaire régional, Tizi Ouzou, Algeria. <sup>11</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’Abruzzo e del Molise ‘G. Caporale’, 64100 Teramo, Italy. <sup>12</sup>Office National de Sécurité Sanitaire des produits Alimentaires (ONSSA), Rabat, Morocco. <sup>13</sup>Facultad de Veterinaria, University of Zaragoza (UZ), Zaragoza, Spain. <sup>14</sup>Laboratory of Zoology, University of Balearics (UIB), Palma de Mallorca, Spain. <sup>15</sup>CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa (FMV-ULisboa), Lisboa, Portugal. <sup>16</sup>Entente interdépartementale pour la démoustication-Méditerranée (EID-Méd), Montpellier, France. <sup>17</sup>Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA), Laboratoire National de l’Élevage et de Recherches Vétérinaires, Dakar, Sénégal. Correspondence and requests for materials should be addressed to S.J. (email: stephanie.jacquet@cirad.fr) or C.G. (email: claire.garros@cirad.fr)

long-distance dispersal, most importantly their ability to diapause at egg stages that allows survival of periods of desiccation, and thus the exploitation of ephemeral water sources. This ability has allowed long-distance migration via global trade of plants and used tires<sup>5,6</sup>. Following migration, the establishment of new populations depends on the suitability of climatic and environmental conditions at the place of arrival. Rapid expansions in distribution associated with global trade have not generally been reported for the genus *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae)<sup>7,8</sup>, although this has been hypothesized for *C. jamaicensis* Edwards<sup>9</sup> and *C. belkini* (Wirth and Arnaud)<sup>10</sup>.

At a local scale, the distribution of major vector species of arboviruses can change according to environmental parameters and in turn influence disease distribution. An example is the primary Australian vector of bluetongue virus (BTV) *C. brevitarsis* Kieffer. The southern limit of distribution of this species on the central coastal region of New South Wales, Australia varies significantly with climatic variables and this in turn determines the limit of BTV and Akabane virus (AKAV) distribution each year<sup>11,12</sup>. Within Europe, it has been hypothesized that changes in the northern limits of *C. imicola* Kieffer in the Mediterranean basin have occurred and coincided with an unprecedented expansion of BTV in this region<sup>13–15</sup>. This hypothesis is challenged by recent genetic analyses that supported a long-time presence of *C. imicola* in the Mediterranean basin<sup>16,17</sup>. *Culicoides imicola* is the primary afro-tropical vector species of BTV and African horse sickness virus (see review in<sup>18,19</sup>).

A key challenge for assessing the recent invasion hypothesis was that systematic data regarding the distribution of *C. imicola* prior to BTV incursions were rarely available. Entomological evidences of *C. imicola* presence in southern Europe (i.e. Balearic Islands, Italy, France, and continental Greece) dated from less than fifteen years<sup>13,20–23</sup>. No prior extensive surveys are available to determine if these territories were *C. imicola*-free before the 2000's records. Since then, established populations of the species seem to have expanded their range by colonizing new habitats at the northern limit of the distribution range. Indeed, additional entomological surveys recorded the presence of the species in Catalonia, Spain<sup>24</sup> and in Var department, France<sup>13</sup>. The observed low abundance of captured insects<sup>25</sup> and physiological status<sup>13</sup> suggest a recent northward expansion of these populations at the northern edge distribution of *C. imicola*.

In the Iberian Peninsula, the first recorded BTV outbreaks occurred in the 1960's but confirmed presence of *C. imicola* populations was first reported in 1983 in Spain<sup>26</sup> and soon afterwards in Portugal<sup>27</sup>. The latitude 40°N (i.e., that of Madrid) was then described as the northernmost limit of *C. imicola* with high abundances and continuous distribution characterizing the south-west quarter of the Iberian Peninsula<sup>25,28,29</sup>. *Culicoides imicola* was observed in the Balearic Islands in 2001–2002<sup>20</sup>. In 2002, the first detection of *C. imicola* in a coastal site of Catalonia (~41–42°N) marked a new incursion step toward the northern expansion of the species distribution<sup>24</sup>. The authors hypothesized that this establishment in Catalonia resulted from a windborne dispersal event from the Balearic Islands where *C. imicola* was found at high abundance<sup>24</sup>.

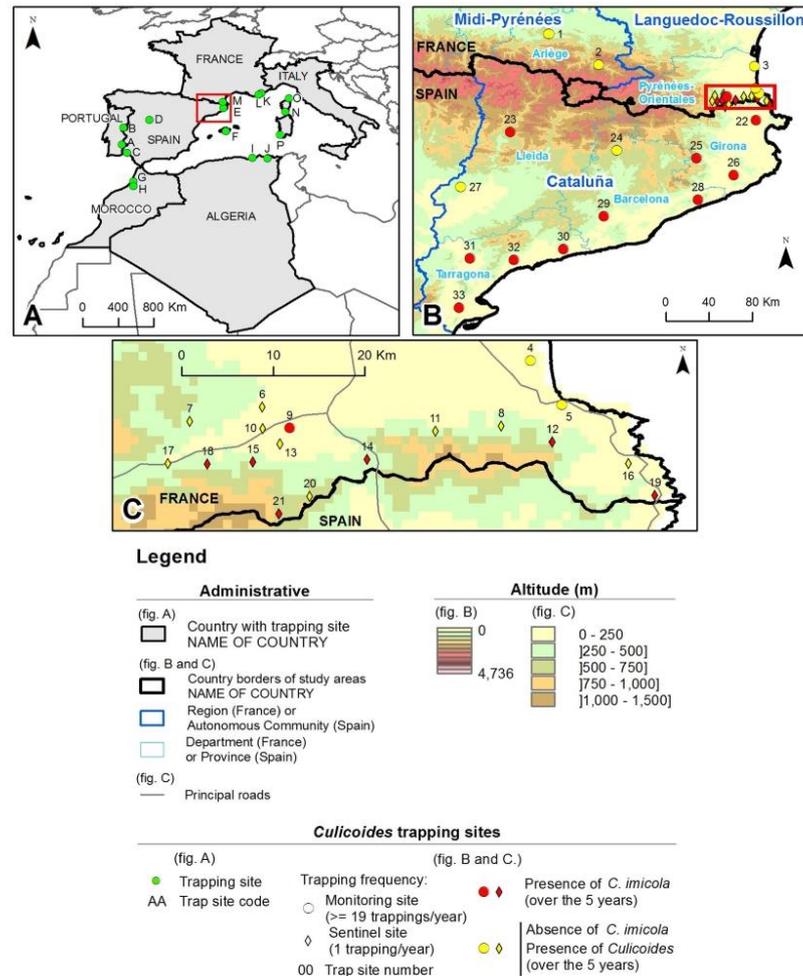
*Culicoides imicola* was recorded in Corsica in 2000<sup>21</sup> and in the south-east of continental France (Var department) in 2003<sup>13</sup>. The establishment of *C. imicola* in the Var department was subsequently confirmed through extensive trapping surveys. There, the local expansion of the species distribution was estimated as 14.5 km/year and thought to be restricted by physical barriers and the limitation of both suitable larval habitats and suitable hosts for blood-feeding<sup>13</sup>.

The recent colonization and the establishment of populations of *C. imicola* in neighbouring countries have led to the question of whether incursions of this species will occur into mainland France<sup>30,31</sup>. Indeed, a recent ecoclimatic niche model predicted that additional habitats will become suitable for *C. imicola* colonization in Western Europe under climate change scenarios and predicted northward range expansion along the Spanish and French border<sup>32</sup>. As part of a risk assessment of this scenario the potential expansion of *C. imicola* from Catalonia to the south of France (Pyrénées-Orientales department) was therefore investigated from 2002 onwards<sup>13</sup>. Three individuals were captured in the Pyrénées-Orientales department in 2008, supporting the presence of *C. imicola* in the region<sup>13</sup>. This paper reports a new wave of range expansion and the establishment of *C. imicola* in the French mainland. We used a unique combination of population genetics and meteorological modelling of long-distance dispersal to trace the origin of these populations in relation to neighboring areas.

## Results

**Entomological surveys.** Within the entire study area, 2,375 nights of trapping were conducted from 2008 to 2012 at 15 sentinel sites along the French-Spanish border (with traps surveyed on a yearly basis) and at 18 monitoring sites in France and Spain (with traps surveyed on monthly or weekly bases) (Supplementary Table 1, Fig. 1). In Spain, *C. imicola* was collected at 10 of the 12 monitoring sites including three sites (Caldes, Piera and Susqueda) that had positive collections for four consecutive years (Supplementary Table 1, Fig. 2). In France, *C. imicola* was observed once at a monitoring site (St-Jean-Pla-de-Corts) during the five years of survey. *Culicoides imicola* was trapped in 6 out of the 15 sentinel sites with the highest records observed in 2012 (11 individuals/night). Maximum catches of *C. imicola* were relatively low at sentinel sites (<11 females/night) and monitoring sites (<24 females/night), except at two Spanish monitoring sites (Caldes and Susqueda) where more than 250 individuals were regularly collected (i.e., 250 individuals/night from 2009 to 2011), indicating established *C. imicola* populations (Fig. 2).

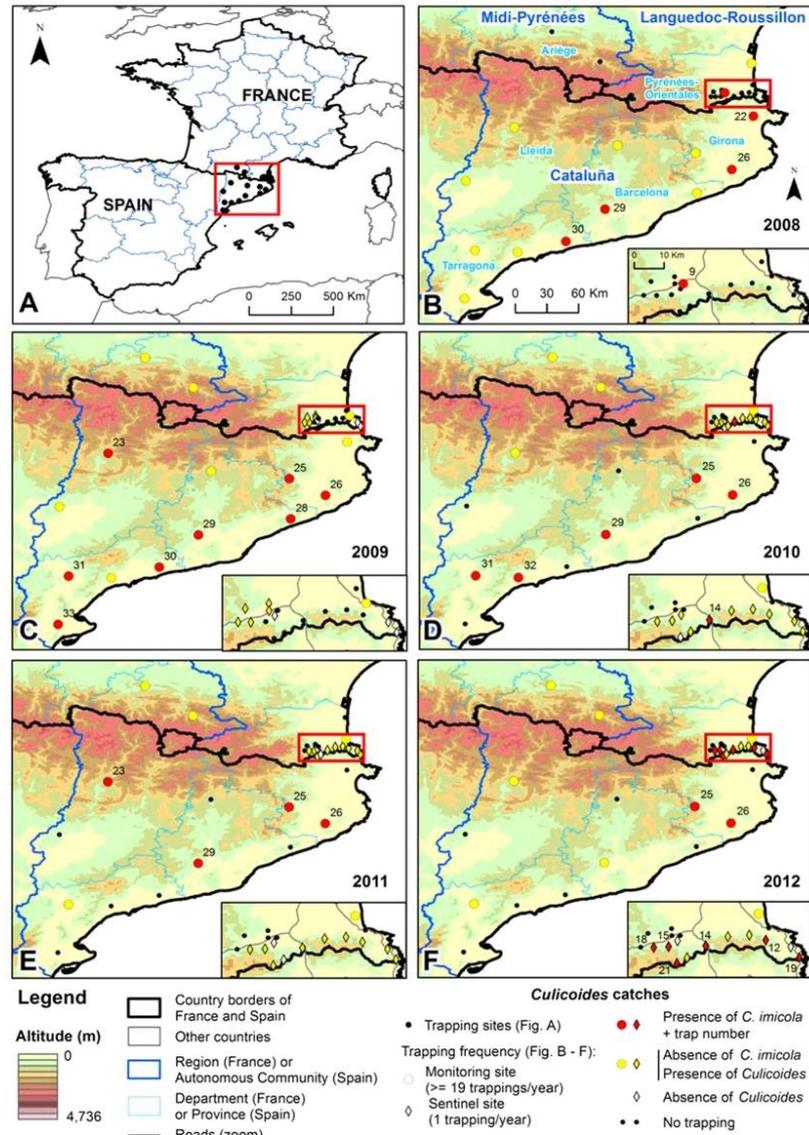
**Within population genetic diversity.** We genotyped a total of 483 *C. imicola* adults sampled from 16 sites at nine microsatellite loci (Table 1, Fig. 1). In addition, a total of 1,107 base pairs of mitochondrial genes COI (474 bp) and CytB (633 bp) were sequenced for a subset of 132 individuals randomly selected among the successful genotyped insects. The analysis of the concatenated mitochondrial data provided a total of 31 haplotypes, among which two (H2 and H7) were dominant and distributed across the populations. The level of genetic variability within populations was comparable among sites ( $0.67 \pm 0.12 \leq H_i \leq 0.95 \pm 0.04$ ) (Supplementary Table 2).



**Figure 1.** Sampling sites for population genetic analyses (A) and entomological surveys (B, C). Code sites are detailed in Table 1 and Supplementary Table 1. Maps were generated using ArcGIS software v10.2.2 (ESRI, Redlands, CA).

**Population genetic structure.** Pairwise allelic tests based on 9 microsatellite loci failed to detect linkage disequilibrium among loci within sample-sites. All populations were in Hardy-Weinberg equilibrium with  $F_{IS}$  estimate ranging from  $-0.038$  to  $0.140$  (Supplementary Table 3). Three models were used to test for recent genetic bottlenecks based on allele frequency data. While tests based on the IAM mutation model suggested potential signatures of past genetic bottlenecks in samples collected in Algeria, Var, Corsica, Pyrénées-Orientales and Sardinia, those based on the most realistic TPM and SMM mutation models were only significant for Roquebrune-sur-Argens (Var department, France) under the TPM model (Supplementary Table 3).

Bayesian clustering analysis based on the microsatellite data identified two genetic groups, as  $\Delta K$  was clearly maximum for  $K=2$  ( $\Delta K_{max}=33$ ), which corresponded to a “western cluster” including Morocco, Spain, Portugal and Majorca, and a “central cluster” consisting of Algeria, Corsica, Sardinia, Pyrénées-Orientales and Var departments (Fig. 3). This spatial genetic structure was consistent with that obtained with the microsatellite Neighbor-joining tree (Fig. 3). Interestingly, the Bayesian clustering analysis and microsatellite neighbor-joining tree suggested that Catalanian population (Girona) is genetically similar to all other continental Spanish



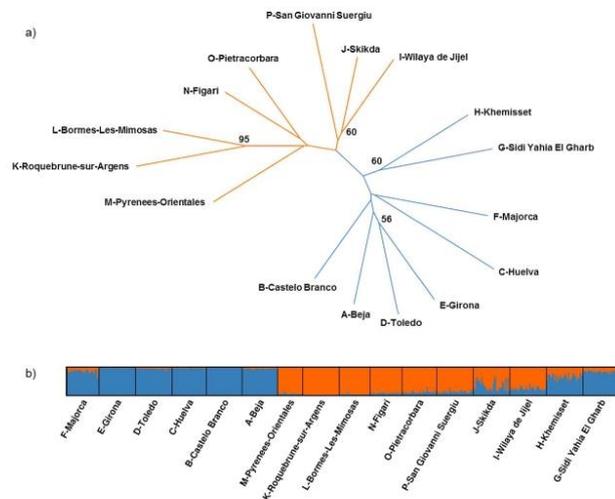
**Figure 2.** Presence/absence map of *C. imicola* in Pyrénées-Orientales and Catalonia from 2008 to 2012. Code sites are detailed in Supplementary Table 1. Maps were generated using ArcGIS software v10.2.2 (ESRI, Redlands, CA).

populations. Likewise, midges from the Balearic Islands (Majorca) were most closely related to Moroccan and Continental Spanish populations.

The spatial pattern was further supported by the median-joining mitochondrial haplotype network, which displayed strong genetic relationships between Pyrénées-Orientales, Sardinian, Algerian and French populations (Var department and Corsica) while the Spanish populations were genetically closer to those in Portugal and

| Country                 | Location                           | Code | Collection year | N <sub>mic</sub> | N <sub>MEDNA</sub> |
|-------------------------|------------------------------------|------|-----------------|------------------|--------------------|
| Algeria                 | Skikda <sup>16</sup>               | J    | 2003            | 32               | 9                  |
|                         | Wilaya de Jijel                    | I    | 2003            | 32               | 8                  |
| Morocco                 | Khemisset                          | H    | 2002            | 32               | 6                  |
|                         | Sidi Yahia El Gharb <sup>16</sup>  | G    | 2004            | 32               | 8                  |
| Portugal                | Castelo Branco <sup>16</sup>       | B    | 2010            | 31               | 8                  |
|                         | Beja                               | A    | 2010            | 31               | 6                  |
| Balearic Islands, Spain | Majorca <sup>16</sup>              | F    | 2012            | 28               | 8                  |
| Continental Spain       | Girona, Catalonia                  | E    | 2012            | 32               | 6                  |
|                         | Toledo, Castilla-La-Mancha         | D    | 2012            | 32               | 8                  |
|                         | Huelva, Andalusia <sup>16</sup>    | C    | 2012            | 30               | 8                  |
| Continental France      | Pyrénées-Orientales                | M    | 2012            | 22               | 17                 |
|                         | Roquebrune-sur-Argens              | K    | 2008            | 32               | 8                  |
|                         | Bormes-les-Mimosas <sup>16</sup>   | L    | 2008            | 27               | 8                  |
| Corsica, France         | Figari                             | N    | 2008            | 28               | 8                  |
|                         | Pietracorbara <sup>16</sup>        | O    | 2008            | 30               | 8                  |
| Sardinia, Italy         | San Giovanni Suergiu <sup>16</sup> | P    | 2012            | 32               | 8                  |

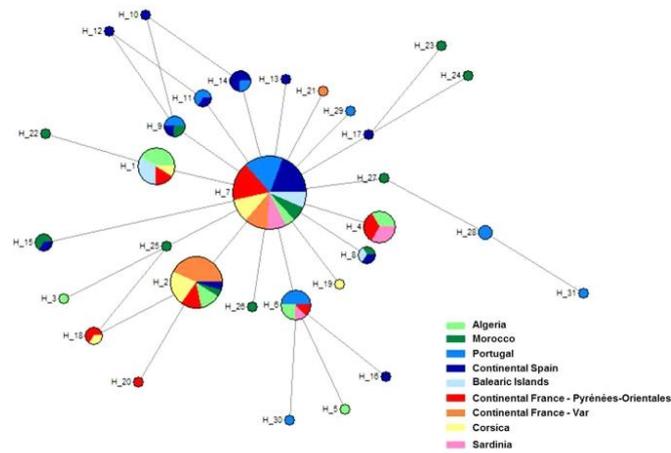
**Table 1. Geographical locations, sampling dates and number of *C. imicola* individuals typed for the population genetics analysis.** N<sub>mic</sub> and N<sub>MEDNA</sub> refer, respectively, to the number of individuals typed for microsatellite analyses and the number mitochondrial sequences obtained. In Pyrénées-Orientales, due to the very small number of individuals collected in each trap, the sample consists of a mix of samples collected in 2012 in different locations (Reynes, Maureillas, Ceret; see Supplementary Table 1).



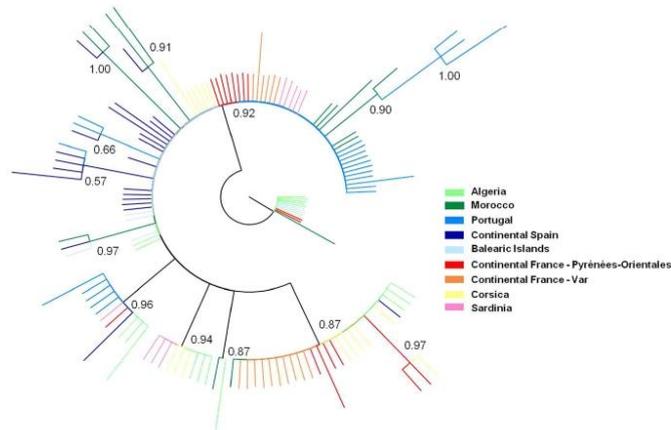
**Figure 3. Microsatellite neighbor-joining tree and genetic clustering of *C. imicola* population samples.** (a) The neighbor-joining tree is based on genetic distance of Cavalli-Sforza & Edwards (1967). Bootstrap values are calculated over 1,000 replicates (only values >60% are shown). (b) Each vertical line represents an individual, and each color represents a cluster. Individuals are grouped by sampling location: Algeria (Skikda, Wilaya de Jijel), Balearic Islands (Majorca), Continental France (Pyrénées-Orientales, Roquebrune-sur-Argens, Bormes-les-Mimosas), Continental Spain [Girona (Catalonia), Toledo, Huelva], Corsica (Figari, Pietracorbara), Morocco (Khemisset, Sidi Yahia El Gharb), Portugal (Beja, Castelo Branco), Sardinia (San Giovanni Suergiu).

Morocco (Fig. 4). These genealogical relationships were also supported by the Bayesian phylogenetic tree (Fig. 5) and the mitochondrial pairwise  $F_{ST}$  values (Supplementary Table 4).

Considering the hierarchy of sampling, significant differentiation was detected between both genetic clusters ( $F_{cluster-total} = 0.016$ ;  $P = 0.0001$ ) but also within clusters ( $F_{populations-clusters} = 0.012$ ;  $P = 0.0001$ ).



**Figure 4. Median-joining haplotype network.** The size of the circles is proportional to the number of individuals with that haplotype. The length of the branches separating haplotypes is proportional to the number of mutational steps between them.



**Figure 5. Mitochondrial Bayesian phylogenetic tree.** Numbers represent the posterior probability and each color refers to a geographical region.

Despite the geographical distances involved, pairwise  $F_{ST}$  estimates based on microsatellite data remained relatively low ( $F_{ST} \leq 0.07$ ; Table 2). The genetic differentiation tests were significant for several pairwise comparisons, and particularly when estimating among two populations that did not belong to the same genetic cluster inferred by STRUCTURE (Table 2).

**Genetic inference of colonization pathways.** We tested the potential routes of colonization of *C. imicola* into Pyrénées-Orientales using ABC methods. Our results support the scenario involving Corsica as the source of Pyrénées-Orientales populations. More specifically, the most probable scenario entails a succession of three colonization events: the colonization of Sardinia by North African individuals, followed by the colonization of Corsica by Sardinian founders, and then colonization of Pyrénées-Orientales by Corsican emigrants ( $P = 0.62$ , 95% CI = [0.60–0.64]; Fig. 6, Supplementary Table 5). The type I and type II errors associated to this scenario were evaluated as 0.28 and 0.06, respectively (Supplementary Table 5). Model checking was carried out for the selected scenario. None of the summary statistics (used and unused for ABC inferences) displayed low probability (i.e.  $P < 0.05$ ), indicating that the selected scenario fits well the observed data (Supplementary Table 6).

| Locations               | Western cluster |          |               |                  |         |               |                       | Central cluster       |                         |                      |               |                 |                        |               |                   |
|-------------------------|-----------------|----------|---------------|------------------|---------|---------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|----------------------|---------------|-----------------|------------------------|---------------|-------------------|
|                         | E-Girona        | D-Toledo | C-Huelva      | B-Castelo Branco | A-Beja  | H-Khemisset   | G-Sidi Yahia El Gharb | M-Pyrénées-Orientales | K-Roquebrune-sur-Argens | L-Bormes-les-Mimosas | N-Figari      | O-Pietracorbara | P-San Giovanni Suergiu | J-Skikda      | I-Wilaya de Jijel |
| F-Majorca               | 0.0095          | 0.0113   | 0.0086        | 0.0057           | -0.0015 | 0.0057        | -0.0017               | <b>0.0242</b>         | 0.0375                  | <b>0.0320</b>        | 0.0126        | 0.0054          | <b>0.0392</b>          | 0.0118        | 0.0158            |
| E-Girona                |                 | -0.0033  | <b>0.0177</b> | -0.0002          | -0.0002 | 0.0089        | 0.0093                | <b>0.0341</b>         | <b>0.0620</b>           | <b>0.0446</b>        | <b>0.0326</b> | <b>0.0203</b>   | <b>0.0352</b>          | <b>0.0265</b> | <b>0.0308</b>     |
| D-Toledo                |                 |          | <b>0.0233</b> | -0.0040          | -0.0038 | 0.0051        | 0.0089                | <b>0.0236</b>         | <b>0.0570</b>           | <b>0.0366</b>        | <b>0.0276</b> | <b>0.0168</b>   | <b>0.0336</b>          | <b>0.0250</b> | <b>0.0340</b>     |
| C-Huelva                |                 |          |               | 0.0066           | 0.0127  | <b>0.0243</b> | 0.0152                | <b>0.0295</b>         | <b>0.0627</b>           | <b>0.0643</b>        | <b>0.0236</b> | <b>0.0228</b>   | <b>0.0423</b>          | <b>0.0244</b> | <b>0.0309</b>     |
| P-Castelo Branco        |                 |          |               |                  | -0.0012 | 0.0033        | 0.0023                | <b>0.0185</b>         | <b>0.0529</b>           | <b>0.0430</b>        | <b>0.0118</b> | <b>0.0104</b>   | <b>0.0172</b>          | 0.0102        | <b>0.0244</b>     |
| P-Beja                  |                 |          |               |                  |         | 0.0079        | 0.0056                | 0.0164                | <b>0.0485</b>           | <b>0.0342</b>        | 0.0143        | <b>0.0082</b>   | <b>0.0262</b>          | 0.0155        | <b>0.0220</b>     |
| H-Khemisset             |                 |          |               |                  |         |               | -0.0074               | <b>0.0142</b>         | <b>0.0405</b>           | <b>0.0322</b>        | <b>0.0139</b> | <b>0.0145</b>   | <b>0.0228</b>          | 0.0082        | <b>0.0251</b>     |
| G-Sidi Yahia El Gharb   |                 |          |               |                  |         |               |                       | 0.0144                | <b>0.0290</b>           | <b>0.0250</b>        | 0.0087        | 0.0068          | 0.0286                 | 0.0021        | <b>0.0193</b>     |
| M-Pyrénées-Orientales   |                 |          |               |                  |         |               |                       |                       | <b>0.0231</b>           | 0.0237               | -0.0003       | 0.0110          | 0.0149                 | 0.0170        | 0.0097            |
| K-Roquebrune-sur-Argens |                 |          |               |                  |         |               |                       |                       |                         | 0.0100               | <b>0.0249</b> | <b>0.0171</b>   | <b>0.0527</b>          | <b>0.0342</b> | <b>0.0279</b>     |
| L-Bormes-les-Mimosas    |                 |          |               |                  |         |               |                       |                       |                         |                      | 0.0247        | <b>0.0210</b>   | <b>0.0472</b>          | <b>0.0305</b> | <b>0.0259</b>     |
| N-Figari                |                 |          |               |                  |         |               |                       |                       |                         |                      |               | -0.0045         | 0.0099                 | 0.0043        | 0.0090            |
| O-Pietracorbara         |                 |          |               |                  |         |               |                       |                       |                         |                      |               |                 | 0.0219                 | 0.0056        | 0.0064            |
| P-San Giovanni Suergiu  |                 |          |               |                  |         |               |                       |                       |                         |                      |               |                 |                        | 0.0044        | 0.0109            |
| J-Skikda                |                 |          |               |                  |         |               |                       |                       |                         |                      |               |                 |                        |               | 0.0002            |

**Table 2. Pairwise  $F_{ST}$  values between *C. imicola* populations samples.**  $F_{ST}$  values are grouped according to the genetic clusters inferred by STRUCTURE v.2.3.3: western cluster (Spain, Portugal, Morocco) and central cluster (Algeria, Continental France, Corsica). The first letter in front of each location name refers to corresponding country: A–B, Portugal; C–E, Continental Spain; F, Balearic Islands; G–H, Morocco; I–J, Algeria; K–M, Continental France; N–O, Corsica; P, Sardinia. Significant values, at the adjusted nominal level (5%) for multiple comparison of 0.000476, are highlighted in bold.

This is also confirmed by a Principal Component analysis (PCA): PCA points simulated from the posterior predictive distribution grouped together closely and centered on the target point corresponding to the real dataset (Supplementary Fig. 1).

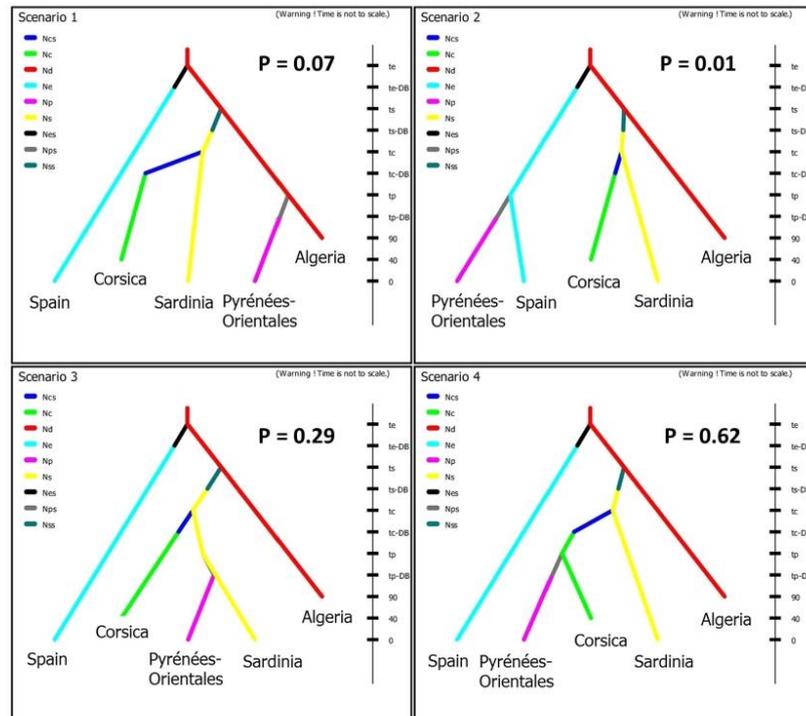
**Long-distance dispersal model outputs.** The areas of the study region most likely to have been source regions of windborne *C. imicola* were assessed using the NAME model. The resulting air frequency map shows that air arriving at the entry point (Saint-Jean-Pla-de-Corts, site 9 in Fig. 1) during the full studied time period (1st of August to 31st of October 2003 to 2008) frequently came from north-eastern Spain and Balearic Islands (Fig. 7, left panel). At some periods however, rare wind-borne transport events made northern Corsica (Fig. 7, right panel) the most likely source for *C. imicola*. Air only occasionally arrived at the trap site from Corsica, other parts of southern France, parts of Italy or the northern coast of Africa within the 36 hour time limit.

The individual trajectory maps described a similar pattern. Full 36-hour back-trajectories for all particles together are presented for each day during the full observation period in supplementary file video clip 1.

## Discussion

This study reports a second incursion of *C. imicola* in continental France beyond the apparent northern edge of the species distribution. By using a combination of standard population genetics and approximate Bayesian computation methods, we were able to determine that this newly discovered population was not closely related to the nearby (~80 km south) populations settled in Catalonia. Instead, the newly settled *C. imicola* population was shown by both nuclear and mitochondrial genetic loci to be closely related to far more distant populations (360 to 1,000 km east or south-east) in the Var department, Corsica, Sardinia and Algeria. Corsica was further supported as the most likely source of introduction by the ABC analyses, suggesting that establishment of *C. imicola* in Pyrénées-Orientales could have occurred through long-distance dispersal from abundant populations in the island (> 500 km from the mainland sampling site). However, other potential population sources such as smaller populations in the Var department or yet undiscovered populations (despite entomological surveillance in this area) between these on the southern coast of France cannot be totally discounted.

Research on the dispersal activity of *Culicoides* is divided into two main areas of focus. Long-distance semi-passive flights on prevailing winds over water bodies have been investigated as a means of both predicting and retrospectively identifying sources of incursions (see ref. 33 for a review). In the current study, we used NAME to simulate the potential for *Culicoides* dispersal to Pyrénées-Orientales and found that trajectories centered primarily on directly surrounding areas, including north-eastern Spain and Balearic Islands. These trajectories also sometimes comprised simulated particles originating from distant areas including northern Corsica and Sardinia, suggesting that midges' dispersal from these sources were possible, but related to rare wind-transport events during the period of abundance of this species.

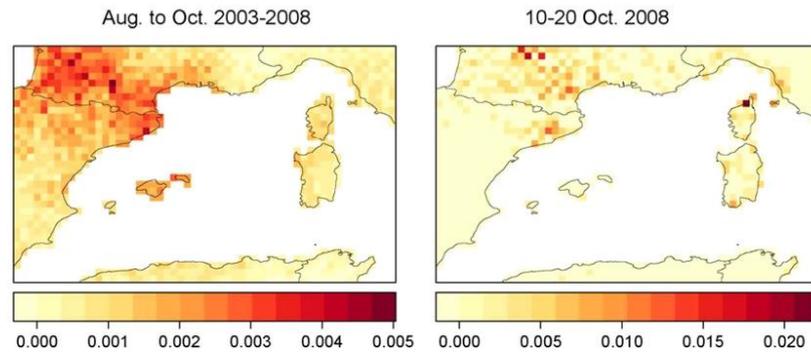


**Figure 6.** Graphical representation of the tested scenarios regarding colonization sources of *C. imicola* in the Pyrénées-Orientales. Microsatellite data were used and data were simulated using an approximate Bayesian computation (ABC) approach. The y-axis represents the time of events (not to scale), time 0 being the most recent sampling date. Nc, Ns, Nd, Ne and Np refer respectively to the effective population sizes, stable over the time, of the populations from Corsica, Sardinia, Algeria, Catalonia and Pyrénées-Orientales and Ncs, Nss, Nes and Nps refer to the effective number founder for Corsica, Sardinia, Catalonia and Pyrénées-Orientales populations. P refers to the probability obtained for each scenario. Details of all scenarios and parameters are shown in Supplementary Tables 5 and 6.

Although the Pyrénées is a limited elevated mountainous chain, it appears to shape the *C. imicola* population genetic structure more than expected. NAME has been most successfully applied to trajectory simulations over water bodies and would require adaptations to be applicable for local-scale movements over land due to the influence of topographical complexity. Abundance of population sources is also a key factor to take into account. The probability to reach a point by long-distance dispersal depends on the number of active midges that will spread and then survive during transportation. The low abundances observed in Catalonia (maximum catch ~12,000 individuals per night), Balearic Islands (mean number 5–26 individuals per night per trap)<sup>34</sup> and the Var department (>100 individuals per night and maximum catch >4,001 individuals per year)<sup>13</sup> compared to Sardinia and Corsica (30,000–100,000 individuals per night)<sup>13,35</sup>, suggest that these populations unlikely to act as a seed source. A combination of high abundance and favorable winds may support the dispersion of midges from Corsica reaching Pyrénées-Orientales.

Combining the results provided by the NAME model and genetics approach suggests that long-distance dispersal events contribute to *C. imicola* introduction and colonization of new areas. Our genetic analyses also allowed the assessment of the origin of the Catalonian populations. We discounted the previous hypothesis of the Catalonian population being sourced from the Balearic Islands via windborne dispersal<sup>24</sup>. The microsatellite neighbor-joining tree as well as the Bayesian clustering analysis indicates instead that the Catalonian population is genetically closer to any other continental Spanish populations than to the insular Balearic population. Moreover, North-Africa appears as a much more likely source of the Balearic populations than Sardinia, which hosts *C. imicola* populations closely related to the French ones.

A second major area of current research in *Culicoides* flight is active dispersal in random directions that can reach 2.21 km daily. This has been investigated recently in northern Europe using capture, mark recapture



**Figure 7. Source of winds potentially transporting *C. imicola* to the trap location in Pyrénées-Orientales.** To generate this map, the NAME dispersion model was run in backwards mode for 36H each day from 1 August to 31 October for the period 2003 to 2008, using 30,000 particles (left panel). We also present the results of the simulations for the period 10–20 Oct. 2008 only (right panel). The probability of pixels as source points for Pyrénées-Orientales was calculated as the total number of particles received in each pixel from the individual daily simulations divided by the total particles received by all the grid cells not located over the sea for each time period. Maps were generated using R software v3.2.2.

(CMR) techniques based on fluorescent dusts<sup>36,37</sup> or immunomarking<sup>38</sup>. Historically, the maximum distance that a recapture has made in this type of study is at 6 km in the peculiar case of *Culicoides mohave* Wirth in the USA<sup>39</sup>, a species which breeds in desert areas. Interestingly, the speed of colonization recorded for *C. imicola* populations over land in the Var region appears to be limited<sup>13</sup>. This may be a consequence of low population density in the Var region<sup>13</sup> and landscape barriers to population spread. The inland limit of *C. imicola* in the Var region in France appears to be restricted by the South Alps. This is consistent with intensive surveys at several sites along the French Mediterranean coast that failed to detect *C. imicola* outside this region between 2002 and 2010<sup>13</sup>. Nonetheless, more targeted surveys of the southern coast of France for further *C. imicola* populations would be useful in ensuring that the range of this species has not been overlooked in these areas. The investigation of landscape barriers to dispersal of *Culicoides* remains a relatively poorly investigated area. Studies of local-scale landscape ecology could fall below the resolution of genetic techniques, such as microsatellite analysis. In this regard, the use of genome-wide single nucleotide polymorphisms (SNPs), accessed via next-generation sequencing methods, may provide greater resolution at a local scale and advance our understanding of population processes<sup>40</sup>. This may in turn enable improvements in the accuracy of predictive models for *Culicoides* dispersal over land through integration of meteorological, landscape and activity-based parameters<sup>33</sup>.

The influence of globalized transport on *Culicoides* dispersal and colonization of new areas remains poorly understood. The introduction of infected *Culicoides* into Europe via trade routes has been cited as one of many potential points of entry of arboviruses, but direct data remains extremely limited<sup>41</sup>. *Culicoides* have been recorded as being present at low number on aircraft (number unknown)<sup>8</sup> or ships (~1 adult/ship)<sup>7</sup>, and such estimates are probably conservative due to the logistical challenges of sampling. Recent modeling analyses showed that the risk of introduction of infected *Culicoides* via transport and trade networks to Spain from other European countries is low<sup>42,43</sup> although these studies are largely based upon very poorly defined parameters. In the current study, Corsica, the Var department, Algeria and Sardinia share no major ruminant or equine trade links with Pyrénées-Orientales, suggesting that windborne dispersal remains the most likely migration means among these localities.

Except in two sites in Spain, the observed *C. imicola* abundance remains very low in the French and Spanish study sites, and no massive expansion was observed, as was observed in the Var department<sup>13</sup>. The role of adverse meteorological conditions (wind, rain) on *Culicoides* population dynamics has been described and may have influenced our results on species abundance. This probably explains the overall low number of *Culicoides* collected in 2009 in France (the week of prospection was particularly rainy and windy). The relatively limited abundance in monitoring sites compared to other parts of the *C. imicola* distribution area e.g.<sup>44</sup> could be explained by climatic conditions that might be less suitable in this region and/or by the fact that this region is presumably the northern edge of *C. imicola* distribution.

Our work highlights that observation bias related to entomological surveys could lead to misinterpretation of routes and population sources of colonization, especially when the targeted species is a small size and highly passive dispersive species. Our results are consistent with the hypothesis of an introduction by winds, into Pyrénées-Orientales from Corsica. The combination of independent approaches using population genetic analysis and modeling of long-distance dispersal of *Culicoides* confirm the importance of windborne transport for the spread of exotic species and infected females. Facing numerous signals of long dispersal of *Culicoides* populations, one should now estimate the frequency of these events, especially when outbreaks are declared in Northern Africa while free statuses are maintained in continental areas.

## Methods

**Entomological surveys and species identification.** Thirty-three sites in France and Spain were sampled for *Culicoides* from 2008 to 2012 (Fig. 1). Two levels of sampling effort can be distinguished (Supplementary Table 1, Figs 1 and 2): monitoring sites were used in the national surveillance network for *Culicoides* populations in the two countries and operated throughout the year on a weekly or monthly basis; sentinel sites in the Pyrénées-Orientales department (France) were visited once a year to survey *C. imicola* expansion from the 2008 detection point (Supplementary Table 1, Fig. 2). Surveys of sentinel sites were carried out during early autumn (September/October) to match the abundance peak of *C. imicola*<sup>13</sup>. Sampling was carried out using ultra-violet light-suction traps (Onderstepoort design) in France and miniature CDC black light traps in Spain, in close proximity to animal shelters containing sheep, cattle or horses and operated from dusk to dawn. Collections were stored in 90% ethanol prior to species identification. Morphological identification of *C. imicola* within samples was carried out to species level using wing pattern<sup>21,45</sup>.

**Population genetics. DNA extraction and amplification.** A total of 483 *C. imicola* individuals from 16 localities in North Africa and south-western Europe were used for microsatellite analyses, and a portion of the mitochondrial genes Cytochrome oxidase subunit I (COI) and Cytochrome b (CytB) were sequenced for 132 successful genotyped individuals (Table 1, Fig. 1). Microsatellite data as well as COI and CytB sequences from eight of the localities were previously published in<sup>16</sup> (see details in Table 1). Genomic DNA was extracted from single adult *C. imicola* using a NucleoSpin96 Tissue Kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany) according to the manufacturer's instructions. Nuclear genotyping was conducted at 9 microsatellite markers previously developed for *C. imicola* by Mardulyn *et al.*<sup>17</sup> (Supplementary Table 7) and following the protocol described in<sup>16</sup>. Insects were sequenced for the mitochondrial genes COI and CytB using the primers C1J1718/C1N2191 and CytB\_12329F/CytB\_13038R, respectively, as described in<sup>16</sup>.

**Sequence analyses.** All the sequences were edited and aligned with ClustalW algorithm implemented in the software GENEIOUS v.6.0.5 (Biomatters, www.geneious.com). COI and CytB data sets were analysed separately and showed the same pattern but with a lower resolution. We thus combined COI and CytB data for all analyses. The genetic diversity was estimated by computing the number of haplotypes (H), haplotype diversity ( $H_d$ ) and nucleotide diversity ( $\pi$ ) using DNASP v.5<sup>46</sup>. The relationships and the geographical distribution of genetic variation among sites were explored with a median-joining network<sup>47</sup> conducted in Network v.4.6.1.2 (www.fluxus-engineering.com) on the concatenated COI and CytB dataset. Genealogical relationships were further investigated by a Bayesian phylogenetic inference as implemented in MRBAYES v.3.2.2<sup>48</sup>. The software JMODELTEST v.2.1.3<sup>49</sup> was used to assess the best-fit substitution model based on the Akaike Information Criterion (AIC). The phylogenetic tree was estimated after 1 million generations of four Markov chains ran twice and sampled every 100 generations. Chain convergence was checked with Tracer v.1.6 software<sup>50</sup> and the first 2,500 generations were discarded as burn-in phase. Finally, population structure was assessed by computing pairwise  $F_{ST}$  values between populations.

**Microsatellite analyses.** The genotype of each individual was characterized with the software GeneMapper<sup>®</sup> 4.0 (AppliedBiosystems). Linkage disequilibrium between all pairs of loci was tested using FSTAT v.2.9.3.2<sup>51</sup>. Within-population departure from Hardy-Weinberg proportions was investigated by estimating the inbreeding coefficient ( $F_{IS}$ ). The significance of this estimator was assessed by randomizing alleles among individuals within samples (10,000 permutations). To visualize the genetic relationships between the sampled sites, we constructed a neighbor-joining (NJ) tree<sup>52</sup> based on the pairwise genetic distances of Cavalli-Sforza and Edwards using the software POPULATIONS v.1.2.30 (<http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>). The robustness of nodes was evaluated by carrying out 1,000 bootstrap replicates.

The Bayesian approach implemented in STRUCTURE v.2.3.3<sup>53</sup> was used to infer spatial genetic structure. We assumed an admixture model with correlated allele frequencies<sup>54</sup> and used the sampling locations (Locprior model) as priors' information<sup>55</sup>. For each value of the number (K) of clusters set between 1 and 14 (number of sampled sites), we performed 10 independent runs of  $10^6$  Markov chain Monte Carlo (MCMC) iterations with a burn-in of  $10^5$ . The most probable number of clusters was inferred using  $\Delta K$  method<sup>56</sup>.

The relative importance of the genetic clusters previously inferred by STRUCTURE and the populations in differentiation was assessed with the multilocus hierarchical F-statistics Fpopulations-clusters and Fclusters-total, respectively. This analysis was performed with Hierfstat package<sup>57</sup>. These tests were based on 10,000 permutations of either *Culicoides* genotypes among populations and within clusters ( $H_0$ : 'Fpopulations-cluster = 0'), or populations among clusters ( $H_0$ : 'Fclusters-total = 0'). Genetic differentiation among samples was further assessed through the Weir and Cockerham<sup>58</sup>'s unbiased estimates  $F_{ST}$  and the significance was tested using the exact G test over 10,000 permutations of genotypes among samples as implemented in FSTAT v.2.9.3.2<sup>51</sup>.

In populations that have undergone a sharp decrease in effective population size, the loss of alleles is faster than the decline of genetic diversity ( $H_e$ ). This results in an increase of heterozygosity across loci. The program BOTTLENECK allows testing of this event in a representative sample of individuals<sup>59</sup>. It has been shown that past bottleneck events will be detected with a high degree of sensitivity using the Infinite Allele Mutation (IAM) model, moderately with the two-phase model (TPM) and dimly with the Stepwise Mutation Model (SMM)<sup>60</sup>. We therefore performed the unilateral Wilcoxon test under the three proposed mutation models<sup>60</sup>. For the TPM model the proportion of SMM was set to 70% and the variance to 30 (default values). The significance was assessed by performing 10,000 replicates.

**Inference of colonization pathways.** Microsatellite data were used to investigate the source of *C. imicola* individuals in Pyrénées-Orientales (Continental France) and test hypotheses regarding the observed genetic clusters using approximate Bayesian computation (ABC). Our hypotheses addressed four potential sources of *C. imicola*: Catalonia, Corsica, Sardinia or Algeria. We tested four demographic scenarios presented in Supplementary Table 4 and Fig. 6 with DIYABC software v.2.0.4<sup>61,62</sup>. Data were simulated under demographic, historical and mutational parameter values used as priors' information given in Supplementary Table 8. We assumed 10 generations per year<sup>63</sup>, a divergence time starting 40 generations ago with 10,000 generations of uncertainty, and a mutation rate ranging from  $10^{-6}$  to  $10^{-4}$ . Genetic variation within and between populations was summarized using a set of statistics implemented in DIYABC including the mean number of alleles, the mean expected heterozygosity<sup>64</sup>, the mean allelic size variance, the Garza-Williamson's M (mean ratio of the number of alleles over the range of allele sizes)<sup>65</sup>, pairwise  $F_{ST}$  values<sup>66</sup> and the classification index (mean individual assignment likelihood)<sup>67</sup>. The posterior probabilities for each of the competing scenarios were calculated by a polychotomous logistic regression<sup>61,62</sup> on 1% of the simulated data sets similar to the observed data set. Confidence in the selected scenario was evaluated by analyzing 100 simulated pseudo-observed data sets (pods) with the same number of loci and individuals as our data set. The parameter values drawn from prior distribution (Supplementary Table 8) and LDA-transformed summary statistics were used to calculate type I and II errors. These latter refer to the probability of excluding the selected scenario when it is true and the probability of selecting the scenario when it is false, respectively. Mean type II error was calculated over the competing scenarios. Finally, we assessed the goodness of fit of the selected scenario by using the model checking option of DIYABC software<sup>61</sup>, which allows evaluating whether the selected scenario and associated posteriors distributions match well with the observed genetic data of *C. imicola*. As recommended by Cornuet *et al.*<sup>61</sup>, we used as test statistics the DIYABC summary statistics not used for model selection in previous ABC treatments. Because this analysis may suffer from non-independence between the summary statistics, we also performed a principal component analysis (PCA) in the space of the summary statistics.

**Model of long-distance biting midge dispersal.** Possible windborne incursion of *C. imicola* into the study region were assessed using the Numerical Atmospheric-dispersion Modelling Environment (NAME) Lagrangian model, designed to simulate the release, transport, mixing and transformation of airborne gases or particulates and their subsequent depletion or removal from the atmosphere<sup>68</sup>. The release and dispersion of hundreds of thousands of model particles allows for representation of the stochastic nature of the atmosphere. The motions of the particles are determined by the ambient three-dimensional wind flow with a random component superimposed to simulate turbulence. The underlying meteorological data necessary to drive the dispersion model was taken from the UK Met Office's Unified Model<sup>69</sup>. For Aug to Oct 2003 to 2008, the horizontal resolution of the Unified Model over Europe was 12 km with a temporal resolution of 1 hour.

NAME was chosen over other dispersion models as it has been previously used to describe wind-borne incursion events that correlate with the timing and location of outbreaks of BTV in Europe<sup>33,70</sup> and compared favorably against another complex dispersion model, MATCH, for outbreaks in Sweden<sup>71</sup>. Simpler wind trajectory models have also been used to assess transport of *Culicoides* in the atmosphere<sup>72-74</sup>. These studies only follow the path taken by one trajectory at very low temporal and spatial resolution (typically 6 hourly at a horizontal resolution of  $0.25^\circ \times 0.25^\circ$ ) and therefore cannot account for the stochastic nature of the atmosphere. Other Lagrangian particle-dispersion models are also available, such as the HYSPLIT model used by<sup>75</sup> to assess incursions of *Culicoides* into Australia. However the underlying meteorological data that is freely available to use with this model for our study period and region is only available at 3-hourly intervals with a horizontal resolution of  $1^\circ$ . These scales would not be adequate for modelling the transport of *Culicoides* within the Mediterranean basin.

In this study, the model was run in backwards mode to simulate the source of winds potentially transporting *C. imicola* to the trap location in Pyrénées-Orientales. In backwards mode the wind direction is reversed and the model steps backwards through time. Saint-Jean-Pla-de-Corts (Site 9, Fig. 1) was selected as the entry point in 2008 as this was the first location where *C. imicola* was recorded. The period from 1 August to 31 October covering the peak of *C. imicola* abundance was assumed to be the period most likely for an introduction to the trap location and we thus modeled particles movement for this period from 2003 to 2008. A large number of model particles (30,000) were released in the model from the trap location for each day in the time window and tracked backwards for 36 hours (assumed to be the maximum flight time for *C. imicola*). At the end of each day's simulation period the total number of particles present in each box of a  $0.25^\circ \times 0.25^\circ$  grid defined over the region were calculated. The greater the number of particles present in each grid box, the greater the proportion of air arriving at the trap site from that source. To assess where air most frequently arrived from during the likely introduction window, the relative probability of pixels as source points for Pyrénées-Orientales was mapped throughout the region (Fig. 7). It was calculated as the total number of particles received in each grid cell from the individual daily simulations divided by the total number of particles received by all the grid cells not located over the sea (which cannot be a source for *Culicoides* populations) for a given period of time. In addition individual trajectories taken by 100 particles on each day in the time window were also calculated and examined to analyse the routes taken by individual air streams. Clustering of trajectories due to a dominant wind pattern can be identified, with some individual trajectories being taken in a very different direction due to turbulence or a separate synoptic system. In Fig. 7, we illustrate the fact that in some periods (e.g. 10–20 Oct. 2008), the pattern is very much different from the general pattern (mean values for 2003 to 2008). To illustrate the modeling process, supplementary file video clip 1 presents the 36-hour trajectories with a one hour time step for days 11/09/2008 and video clip 2 shows the full 36-hour back-trajectories for all particles together for each day during the full observation period (2003 to 2008).

## References

- Sanders, C., Mellor, P. S. & Wilson, A. J. Invasive arthropods. *Rev sci tech Offint Epiz* **29**, 273–286 (2010).
- Bonizzoni, M., Gasperi, G., Chen, X. & James, A. A. The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: current knowledge and future perspectives. *Trends Parasitol* **29**, 460–468 (2013).
- Kaufman, M. G. & Fonseca, D. M. Invasion biology of *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae). *Annu Rev Entomol* **59**, 31–49 (2014).
- Schaffner, F., Medlock, J. M. & Van Bortel, W. Public health significance of invasive mosquitoes in Europe. *Clin Microbiol Infect* **19**, 685–692 (2013).
- Medlock, J. M. *et al.* A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public health risks, and control options. *Vector Borne Zoonotic Dis* **12**, 435–447 (2012).
- Scholte, E. J. *et al.* Accidental importation of the mosquito *Aedes albopictus* into the Netherlands: a survey of mosquito distribution and the presence of dengue virus. *Med Vet Entomol* **22**, 352–358 (2008).
- Nie, W. Z., Li, J. C., Li, D. X. & Gratz, N. G. A preliminary report of introduced living biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) found on entry ships arriving at Qinhuaogang Port, China. *Med Entomol Zool* **56**, 359–361 (2005).
- Reye, E. J. The problems of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in Queensland. *Australian J Entomol* **3**, 1–6 (1964).
- Meiswinkel, R. & Labuschagne, K. Goffredo M. Christopher Columbus and *Culicoides*: was *C. jamaicensis* Edwards, 1922 introduced into the Mediterranean 500 years ago and later re-named *C. paolae* Boorman 1996? *Vet Ital* **40**, 340–344 (2004).
- Duval, J., Riviere, F. & Pichon, G. Quelques aspects bio-écologiques de *Culicoides belkini* (Wirth et Arnaud, 1969) (Diptera: Ceratopogonidae). *Cah ORSTOM sér Ent med parasitol* **16**, 273–277 (1978).
- Bishop, A. L., Spohr, L. J. & Barchia, I. M. Effects of altitude, distance and waves of movement on the dispersal in Australia of the arbovirus vector, *Culicoides brevitarsis* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae). *Prev Vet Med* **65**, 135–145 (2004).
- Bishop, A. L., Kirkland, P. D., McKenzie, H. J. & Barchia, I. M. The dispersal of *Culicoides brevitarsis* in eastern New South Wales and associations with the occurrences of arbovirus infections in cattle. *Aust Vet J* **73**, 174–178 (1996).
- Venail, R. *et al.* Assessing diversity and abundance of vector populations at a national scale: example of *Culicoides* surveillance in France after bluetongue virus emergence. In: *Parasitology Research Monographs* (eds Mehlhorn H.) pp. 77–102. Berlin, Springer-Verlag (2012).
- Purse, B. V. *et al.* Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nat Rev Microbiol* **3**, 171–181 (2005).
- Mellor, P. S. & Wittmann, E. J. Bluetongue virus in the Mediterranean Basin 1998–2001. *Vet J* **164**, 20–37 (2002).
- Jacquet, S. *et al.* Colonization of the Mediterranean Basin by the vector biting midge species *Culicoides imicola*: an old story. *Mol Ecol* **24**, 5707–5725 (2015).
- Mardulyn, P. *et al.* 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 (2013).
- Mellor, P. S. African horse sickness: transmission and epidemiology. *Vet Res* **24**, 199–212 (1993).
- Mellor, P. S., Boorman, J. & Baylis, M. *Culicoides* biting midges: Their role as arbovirus vectors. *Ann Rev Entomol* **45**, 307–340 (2000).
- Miranda, M. A., Borrás, D., Rincón, C. & Alemany, A. Presence in the Balearic Islands (Spain) of the midges *Culicoides imicola* and *Culicoides obsoletus* group. *Med Vet Entomol* **17**, 52–54 (2003).
- Delécolle, J.-C. & de La Rocque, S. Contribution à l'étude des *Culicoides* de Corse. Liste des espèces recensées en 2000/2001 et redescription du principal vecteur de la fièvre catarrhale ovine: *C. imicola* Kieffer, 1913 (Diptera: Ceratopogonidae). *Bull Soc Entomo France* **107**, 371–379 (2002).
- Goffredo, M., Conte, A., Coccioletto, R. & Meiswinkel, R. The distribution and abundance of *Culicoides imicola* in Italy. *Vet Ital* **47**, 22–32 (2003).
- Patakakis, M. J. *Culicoides imicola* in Greece. *Vet Ital* **40**, 232–234 (2004).
- Sarto i Monteys, V., Ventura, D., Pagés, N., Aranda, C. & Escosa, R. Expansion of *Culicoides imicola*, the main bluetongue virus vector in Europe, into Catalonia, Spain. *Vet Rec* **156**, 415–417 (2005).
- Acevedo, P. *et al.* A broad assessment of factors determining *Culicoides imicola* abundance: modelling the present and forecasting its future in climate change scenarios. *PLoS One* **5**, e14236 (2010).
- Mellor, P. S., Boorman, J., Wilkinson, P. J. & Martínez-Gómez, F. Potential vectors of bluetongue and African horse sickness in Spain. *Vet Rec* **112**, 229–230 (1983).
- Mellor, P. S., Jennings, D. M., Wilkinson, P. J. & Boorman, J. *Culicoides imicola*: a bluetongue virus vector in Spain and Portugal. *Vet Rec* **116**, 589–590 (1985).
- Ortega, M. D., Mellor, P. S., Rawlings, P. & Pro, M. J. The seasonal and geographical distribution of *Culicoides imicola*, *C. pulicaris* group and *C. obsoletus* group biting midges in central and southern Spain. *Arch Virol Suppl* **14**, 85–91 (1998).
- Rawlings, P., Pro, M. J., Pena, I., Ortega, M. D. & Capela, R. 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 (1997).
- Goffredo, M., Conte, A. & Meiswinkel, R. Distribution and abundance of *Culicoides imicola*, *Obsoletus* Complex and *Pulicaris* Complex (Diptera: Ceratopogonidae) in Italy. *Vet Ital* **40**, 270–273 (2004).
- Goldarazena, A. *et al.* First record of *Culicoides imicola*, the main vector of bluetongue virus in Europe, in the Basque Country (northern Spain). *Vet Rec* **162**, 820–821 (2008).
- Guichard, S. *et al.* Worldwide niche and future potential distribution of *Culicoides imicola*, a major vector of bluetongue and African horse sickness viruses. *PLoS One* **9**, e112491 (2014).
- Burgin, L. E. *et al.* Investigating incursions of bluetongue virus using a model of long-distance *Culicoides* biting midge dispersal. *Transbound Emerg Dis* **60**, 263–272 (2013).
- Miranda, M., Rincón, C. & Borrás, D. Seasonal abundance of *Culicoides imicola* and *C. obsoletus*. *Vet Ital* **40**, 293 (2004).
- Ippoliti, C. *et al.* Can landscape metrics help determine the *Culicoides imicola* distribution in Italy? *Geospat health* **8**, 267–277 (2013).
- Kirkeby, C., Bødker, R., Stockmarr, A., Lind, P. & Heegaard, P. M. Quantifying dispersal of European culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) vectors between farms using a novel mark-release-recapture technique. *PLoS One* **8**, e61269 (2013).
- Kluiters, G., Swales, H. & Baylis, M. Local dispersal of palaeartic *Culicoides* biting midges estimated by mark-release-recapture. *Parasit Vectors* **8**, 86 (2015).
- Sanders, C. J. & Carpenter, S. Assessment of an immunomarking technique for the study of dispersal of *Culicoides* biting midges. *Infect Genet Evol* **28**, 583–587 (2014).
- Brenner, R. J., Wargo, M. J., Stains, G. S. & Mulla, M. S. The dispersal of *Culicoides mohave* (Diptera: Ceratopogonidae) in the desert of Southern California. *Mosq News* **44**, 343–350 (1984).
- Rasic, G., Filipovic, I., Weeks, A. R. & Hoffmann, A. A. Genome-wide SNPs lead to strong signals of geographic structure and relatedness patterns in the major arbovirus vector, *Aedes aegypti*. *BMC Genomics* **15**, 275 (2014).
- Carpenter, S., Wilson, A. J. & Mellor, P. S. *Culicoides* and the emergence of bluetongue virus in northern Europe. *Trends Microbiol* **17**, 172–178 (2009).
- Napp, S. *et al.* Assessment of the risk of a bluetongue outbreak in Europe caused by *Culicoides* midges introduced through intracontinental transport and trade networks. *Med Vet Entomol* **27**, 19–28 (2013).
- de Vos, C. J., Hoek, C. A. & Nodelijk, G. Risk of introducing African horse sickness virus into the Netherlands by international equine movements. *Prev Vet Med* **106**, 108–122 (2012).

44. Venter, G. J., et al. *Culicoides* species abundance and potential over-wintering of African horse sickness virus in the Onderstepoort area, Gauteng, South Africa. *JS Afr Vet Assoc* **85**, 1–6 (2014).
45. Delécolle, J. C. Nouvelle contribution à l'étude systématique et iconographique des espèces du genre *Culicoides* du Nord-est de la France (eds. Université de Strasbourg (1985).
46. Librado, P. & Rozas, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**, 1451–1452 (2009).
47. Bandelt, H. J., Forster, P. & Röhl, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* **16**, 37–48 (1999).
48. Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* **17**, 754–755 (2001).
49. Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. & Posada, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* **9**, 772 (2012).
50. Rambaut, A., Suchard, M. A., Xie, D. & Drummond, A. J. Tracer v1.6, Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>. (2014).
51. Goudet, J. Fstat version 1.2: a computer program to calculate Fstatistics. *J Heredity* **86**, 485–486 (1995).
52. Takezaki, N. & Nei, M. Genetic Distances and Reconstruction of Phylogenetic Trees From Microsatellite DNA. *Genetics* **144**, 389–399 (1996).
53. Pritchard, J. K., Stephens, M. & Donnelly, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945–959 (2000).
54. Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J. K. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics* **164**, 1597–1587 (2003).
55. Hubisz, M. J., Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J. K. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Mol Ecol Res* **9**, 1322–1332 (2009).
56. Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol Ecol* **8**, 2611–2620 (2005).
57. Goudet, J. Hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Mol Ecol Notes* **5**, 184–186 (2005).
58. Weir, B. S. & Cockerham, C. C. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population-Structure. *Evolution* **38**, 1358–1370 (1984).
59. Piry, S., Luikart, G. & Cornuet, J. M. Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *J Heredity* **90**, 502–503 (1999).
60. Cornuet, J. M. & Luikart, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* **144**, 2001–2014 (1996).
61. Cornuet, J. M., Ravigné, V. & Estoup, A. Inference on population history and model checking using DNA sequence and microsatellite data with the software DIYABC (v1.0). *Bioinformatics* **11**, 401 (2010).
62. Cornuet, J. M. et al. Inferring population history with DIYABC: a user-friendly approach to approximate Bayesian computation. *Bioinformatics* **24**, 2713–2719 (2008).
63. Braverman, Y. & Linley, J. R. Parity and voltinism of several *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) in Israel, as determined by two trapping methods. *J Med Entomol* **25**, 121–126 (1988).
64. Nei, M. *Molecular evolutionary genetics*. New York, Columbia University Press (1987).
65. Garza, J. C. & Williamson, E. G. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Mol Ecol* **10**, 305–318 (2001).
66. Weir, B. S. & Cockerham, C. C. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution* **38**, 1358–1370 (1984).
67. Pascual, M. et al. Introduction history of *Drosophila subobscura* in the New World: a microsatellite-based survey using ABC methods. *Mol Ecol* **16**, 3069–3083 (2007).
68. Jones, A. R., Thomson, D. J., Hort, M. & Devenish, B. The U.K. Met Office's next-generation atmospheric dispersion model, NAME III, In Borrego, C. & Norman, A.-L. (Eds) Air Pollution Modeling and its Application XVII (Proceedings of the 27th NATO/CCMS International Technical Meeting on Air Pollution Modelling and its Application), Springer, pp. 580 (2007).
69. Davies, T. et al. A new dynamical core for the Met Office's global and regional modelling of the atmosphere. *Q J Roy Meteor Soc* **131**, 1759–1782 (2005).
70. Gloster, J., Burgin, L., Witham, C., Athanassiadou, M. & Mellor, P. Bluetongue in the United Kingdom and northern Europe in 2007 and key issues for 2008. *Vet Rec* **162**, 298–302 (2008).
71. Agren, E. C., Burgin, L. E., Lewerin, S. S., Gloster, J. & Elvander, M. Possible means of introduction of bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) to Sweden in August 2008: comparison of results from two models for atmospheric transport of the *Culicoides* vector. *Vet Rec* **167**, 484–488 (2010).
72. Hendrickx, G. et al. A wind density model to quantify the airborne spread of *Culicoides* species during north-western Europe bluetongue epidemic, 2006. *Prev Vet Med* **87**, 162–181 (2008).
73. Ducheyne, E. et al. Quantifying the wind dispersal of *Culicoides* species in Greece and Bulgaria. *Geospat Health* **1**, 177–189 (2007).
74. Ducheyne, E. et al. A stochastic predictive model for the natural spread of bluetongue. *Prev Vet Med* **99**, 48–59 (2011).
75. Eagles, D., Walker, P., Zalucki, M. & Durr, P. Modelling spatio-temporal patterns of long-distance *Culicoides* dispersal into northern Australia. *Prev Vet Med* **110**, 312–322 (2013).

### Acknowledgements

The authors would like to thank the people that helped with *Culicoides* trappings in France, Spain, Portugal and Northern Africa (EID-Med agents, farmers, Thierry Baldet (Cirad), Catherine Cêtre-Sossah (Cirad), Jean-Claude Delécolle (University of Strasbourg)), and *Culicoides* identification (Xavier Allène (Cirad), Ignace Rakotoarivony (Cirad), Jean-Claude Delécolle (University of Strasbourg)). This work was granted by the Chercheur d'Avenir 2011 call from the Languedoc-Roussillon region, France and the Ministère de l'Agriculture. SJ was partially funded by the Chercheur d'Avenir grant and was supported by the Ecole Internationale de Recherche d'Agreenium (EIR-A). SC, LB and CS were funded by Defra project SE: 4211. This study was partially funded by EU grant FP7-613996 VMERGE and is catalogued by the VMERGE Steering Committee as VMERGE007 (<http://www.vmerge.eu>). The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and don't necessarily reflect the views of the European Commission.

### Author Contributions

S.J., K.H., T.B., H.G., C.G. designed the study. S.J. genotyped the samples. S.J., K.H., L.E.B., S.C., C.S., A.H.D., J.B., T.B., H.G. and C.G. analyzed the data. N.P., S.T., S.L., M.D., M.G., Y.L., J.L., M.A.M.-C., I.P.D.F., D.W.R. and M.-L.S.-R. collected the *C. imicola* samples. C.C., J.B., T.B. and H.G., contributed to the manuscript firstly written by S.J., K.H. and C.G. All authors read and commented the final manuscript version.

#### Additional Information

**Accession codes:** The COI and CytB sequences generated in this study were deposited in GenBank under accession numbers KX083462 - KX083520 and KX083403 - KX083461.

**Supplementary information** accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

**Competing financial interests:** The authors declare no competing financial interests.

**How to cite this article:** Jacquet, S. *et al.* Range expansion of the Bluetongue vector, *Culicoides imicola*, in continental France likely due to rare wind-transport events. *Sci. Rep.* **6**, 27247; doi: 10.1038/srep27247 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Contents lists available at ScienceDirect

## Ticks and Tick-borne Diseases

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

## Low effective population sizes in *Amblyomma variegatum*, the tropical bont tick

K. Huber<sup>a,\*</sup>, S. Jacquet<sup>a,b,1</sup>, R. Rivallan<sup>c,d</sup>, H. Adakal<sup>a,b,e,f,2</sup>, N. Vachieri<sup>a,b</sup>, A.M. Risterucci<sup>c,d</sup>, C. Chevillon<sup>g</sup>

<sup>a</sup> ASTRE, Univ Montpellier, CIRAD, INRA, Montpellier, France

<sup>b</sup> CIRAD, UMR ASTRE, F-34398, Montpellier, France

<sup>c</sup> CIRAD, UMR AGAP, F-34398, Montpellier, France

<sup>d</sup> AGAP, Univ Montpellier, CIRAD, INRA, Montpellier SupAgro, Montpellier, France

<sup>e</sup> CIRDES URBIO, 01 BP 454, Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso

<sup>f</sup> Département des Sciences et Techniques de l'Élevage (DSTE/FASE), Université Dan Dicko Dankoulodo, BP 465, Maradi, Niger

<sup>g</sup> MIVEGEC, Univ Montpellier, CNRS, IRD, Montpellier, France

## ARTICLE INFO

## Keywords:

*Amblyomma variegatum*  
Effective population size  
Microsatellite markers

## ABSTRACT

Effective population sizes have rarely been estimated in ticks despite the importance of this parameter for evaluating the evolutionary and adaptive potential of tick populations. The present study was aimed at evaluating the effective population sizes of *Amblyomma variegatum*, the tropical bont tick, in three villages in Burkina Faso. For this purpose, microsatellites markers were developed. Eight out of 19 assessed markers provided good amplification results with 4 to 24 alleles recorded per marker on 216 genotyped ticks. The within-samples polymorphism was congruent with Hardy-Weinberg expectations at four markers while sex linkage and/or null alleles were observed at the others. As sampling involved two tick generations, effective population sizes were independently estimated by two methods insensitive to heterozygosity: the first one is based on linkage disequilibrium analysis within a single cohort while the second uses the changes in allele frequencies across generations. Both methods estimated the number of reproducing ticks ranging from two to a few tens reproductive adults per village and cohort. Such small estimates are congruent with the rarity of records of acaricide resistance in *A. variegatum*.

## 1. Introduction

While the past decades have seen the multiplication of successful applications of phylogenetic and population genetics analyses to many ticks for tracking their historical changes in distribution, identifying cryptic species as well as their mating patterns, evaluating their dispersal ranges and/or understanding how biotic and/or abiotic parameters jointly define their population genetic structure (see for review Araya-Anchetta et al., 2015), evaluation of effective population sizes ( $N_e$ ) in ticks had so far been restricted to the *Rhipicephalus microplus* complex (Koffi et al., 2006a; De Meeüs et al., 2010; Biguezoton, 2016). This is curious given, on the one hand, the amount of the tick literature related to the efficacy of tick-control programs and/or acaricide resistance, and on the other hand, the key importance of  $N_e$  in the

evolutionary potential of the studied populations. Indeed, the acquisition of new alleles (via migration or mutation) is proportional to  $N_e$ , the polymorphism lost by a population at each generation via genetic drift is proportional to  $1/N_e$  and thus only the selection pressures  $s$  verifying  $s > 1/N_e$  overcome the effect of drift to actually impact the frequency of selected alleles (e.g. Hartl and Clark, 1997; Hedrick, 2000).

The present study was aimed at evaluating the effective population sizes in Burkina Faso of a three-host tick species of major veterinary importance in West Africa: the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum*. There, *A. variegatum* used to be the most abundant tick species found on livestock (Kabore et al., 1998; Farougou et al., 2006, 2007) until the last decade when *R. microplus* started to invade this area (Madder et al., 2011). Today, it remains the second (after *R. microplus*) most abundant tick on cattle throughout Benin and Burkina Faso

\* Corresponding author at: UMR Animals, Health, Territories, Risk and Ecosystems (ASTRE), INRA, Cirad, Cirad Campus international de Baillarguet, TA A117/E, 34398 Montpellier cedex 5, France.

E-mail address: [karine.huber@cirad.fr](mailto:karine.huber@cirad.fr) (K. Huber).

<sup>1</sup> Present address: UMR 5558 Laboratoire Biométrie et Biologie évolutive, Université Claude Bernard Lyon I, CNRS, Villeurbanne, France.

<sup>2</sup> Present address: Département des Sciences et Techniques de l'Élevage (DSTE/FASE), Université Dan Dicko Dankoulodo, BP 465 Maradi, Niger.

<https://doi.org/10.1016/j.ttbd.2018.08.019>

Received 8 February 2018; Received in revised form 17 July 2018; Accepted 29 August 2018

Available online 31 August 2018

1877-959X/ © 2018 The Authors. Published by Elsevier GmbH. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

(Biguezoton et al., 2016). Originated from sub-Saharan areas, *A. variegatum* has been reported in more than 30 African countries (Walker et al., 2003) and got out of Africa via the cattle trade to reach Indian Ocean islands by the 7<sup>th</sup> century (Stachurski et al., 2013) and the Caribbean's in mid-18<sup>th</sup> century (Maillard and Maillard, 1998). The veterinary importance of *A. variegatum* arises from a combination of factors. Firstly, *A. variegatum* directly impairs animal growth and tend to heavily reduce milk production due to its preference as adults to attach on cattle udder (Stachurski, 2000a). Secondly, its saliva favors the development of severe acute dermatophilosis, a bacterial skin disease of animals (Barré et al., 1988). Thirdly and finally, *A. variegatum* vectors *Ehrlichia ruminantium*, the agent of heartwater (cowdriosis), that induces up to 80% mortality in susceptible sheep and goats (Uilenberg, 1983) and induces morbidity in the cattle breeds imported from free-heartwater areas (Uilenberg and Camus, 1993). *E. ruminantium* infection risks are quite high in West Africa: 10–16% of *A. variegatum* adult and nymphal stages are infected in Benin (Farougou et al., 2012) as well as 39–61% cattle and at least 51% sheep and goats in Ghana (Farougou et al., 2013; Koney et al., 2004). The only commercial vaccine available to protect against heartwater is based on the infectious challenge using a virulent *E. ruminantium* strain (Bezuidenhout, 1989) followed by antibiotic treatments. Meanwhile, selecting West African cattle breeds for poor attractiveness to *A. variegatum* was shown to be difficult (Stachurski, 2007). As a result, the usage of acaricide footbaths still seems as the most accurate way to protect cattle from all the deleterious effects of *A. variegatum* (Stachurski and Lancelot, 2006). As the durability of such protection would depend on the potential of *A. variegatum* to evolve acaricide resistance, we estimated the effective population sizes of *A. variegatum* in three neighbor villages from Burkina Faso. To this purpose, we sampled two successive tick generations within each village and characterized the polymorphism of newly developed microsatellite markers per village and tick-generation.

## 2. Material and methods

### 2.1. Tick sampling

*Amblyomma variegatum* ticks were collected in 2007 on herds merging cattle, sheep and goats which foraged communal pastures from either one of three neighbor villages (pairwise distances ~ 10 km) from Burkina Faso: Bekuy (3.91 °W, 11.60 °N), Sara (3.83 °W, 11.71 °N) and Lamba (4.05 °W, 11.66 °N). There, *A. variegatum* reproduces once a year with adults attaching on hosts in the early rainy season (mid-May to July), freshly hatched larvae in late rainy season (September) and nymphs in the early dry season (November) (Stachurski, 2006). Three sampling campaigns were performed in May, July and November with the purpose to genotype ~25 ticks per village and campaign. In May and July, the only available ticks were adults feeding on cattle. The next tick generation was collected as nymphs on sheep and goats in November. As nymphs cannot be sexed, they were allowed to molt under laboratory controlled conditions, so that sexing and genotyping were performed on adult stages.

### 2.2. Identification of microsatellite markers

Microsatellite loci were isolated from two microsatellite enriched libraries according to Billotte et al. (1999). Total genomic DNA was extracted from a mix of adult males and females *A. variegatum* with the Qiamp DNA mini kit (Qiagen) following manufacturer's instructions. DNA was restricted by *HaeIII* and fragments were ligated to Rsa21 and Rsa25 self-complementary primers (5'-CTCTTGCTTACGCGTGGACTA-3' and 5'-TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA-3') and amplified by polymerase chain reaction (PCR). Products were hybridized to biotin-labelled I<sub>5</sub>(GA)<sub>8</sub> and I<sub>5</sub>(GT)<sub>8</sub> probes and fragments containing microsatellite sequences were captured using Streptavidin Magnetic Paramagnetic Particles (Promega). Enriched fragments were

PCR amplified, cloned in pGEM-T (Promega) and transformed in XL1-Blue competent cells (Stratagene). Randomly picked recombinant colonies were PCR amplified with Rsa21 primer. PCR products were run on a 1.2% agarose gel and transferred onto a Hybond N + membrane (Amersham) which were hybridized with [<sup>32</sup>P]dATP end-labelled (GA)<sub>15</sub> and (GT)<sub>15</sub> probes to improve fragment selection. Among these clones 55% gave a satisfactory positive signal. A total of 192 positive clones were sent for sequencing (Genome Express). Sequences were analyzed and primers were designed using the PRIMER 3 program (Rozen and Skaletsky, 2000).

### 2.3. Genotyping

Nineteen loci were preliminary tested on DNA extracts from individual ticks obtained using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). PCR amplifications were performed following a M13 protocol where each forward primer is 5'-tagged with the M13-tail sequence (5'-CAGCAG GTTGAAAACGAC-3') and a 5'-dye (IR700 or IR800) labeled M13 is added to the reaction mix.

PCR amplifications were run in a final volume of 20 µl containing 10-to-50 ng of genomic DNA, PCR buffer (Qiagen), 60 µM dNTPs (Invitrogen), 1.5–3.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 µM of primer, 0.16 µM of M13 tailed primer, 0.2 µM M13 dye and 0.5 U Taq DNA polymerase (Qiagen). PCR amplifications were performed using a "touch down" procedure defined as followed: a denaturing step at 95 °C for 5 min; 10 cycles including a denaturing step at 95 °C for 1 min, a hybridization step at (Ta + 7) °C for 1 min with Ta decreasing by 0.7 °C at each cycle, and an elongation step at 72 °C for 1 min; 25 cycles including a denaturing step at 95 °C for 1 min, a hybridization step at Ta for 1 min, and elongation at 72 °C for 1 min; the final elongation step was operated for 5 min at 72 °C. An automated infrared fluorescence technology (4300; LI-COR Biosciences, [www.licor.com](http://www.licor.com)) was used to detect each PCR product sample.

### 2.4. Data analyses

The possible occurrence of genotyping errors due to the presence of null alleles, stutter bands and/or large-alleles dropout was assessed with MICROCHECKER 2.2.3 (van Oosterhout et al., 2004). Genotypic data were analyzed using GENEPOP 4.2 (Raymond and Rousset, 1995; Rousset, 2008) and FSTAT 2.9.4 (Goudet, 1995). Estimates of *F*<sub>IS</sub> were computed according to Weir and Cockerham (1984). Deviations from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) were tested using *F*<sub>IS</sub> statistic and performing 10 000 within-samples permutations of alleles among individuals. Assuming null alleles as the primary cause of heterozygote deficits, we estimated their frequency per sample using Brookfield's (1996) method. We then tested, by an exact binomial test, the goodness of fit of the observed frequencies of blank genotypes (putative null homozygotes) to those expected under the hypothesis of panmixia (unilateral tests). Genotypic equilibrium among pairs of loci was tested over all samples with the randomization log-likelihood G-based test that is implemented in FSTAT software, and by performing 10 000 within samples permutations of bi-loci genotypes. This generates a distribution in P-values that was compared to an exact binomial test undertaken with R 2.15.2 (R Development Core Team, 2018) in order to detect cases where the multiplicity of tests resulted in a false rejection of the null hypothesis tested (de Meeuus et al., 2009).

We tested whether the genotypic composition of tick samples clustered accordingly to the sampling geography and/or sampling dates using the principal component analyses adapted to genotypic data that is implemented in PCA-GEN v.1.2 (<http://www2.unil.ch/popgen/software/pcagen.htm>). Permutation tests included in the program enabled testing the significance of individual axes inertia (10 000 genotype randomizations).

Estimation of the effective population sizes (*N*<sub>e</sub>) was performed using the two methods implemented in NEESTIMATOR v1.3 software

**Table 1**  
**Characterization of eight microsatellite markers in *Amblyomma variegatum*:** description of marker (name, GenBank access to reference clone, primers' sequence, structure of repeated array), thermocycling conditions (annealing temperature, Ta; MgCl<sub>2</sub> concentration) and genetic variation (alleles number, Na; allele size range; allelic richness, A<sub>R</sub>).

| Locus name | GenBank Accession no. | Primers (5' > 3')                              | Repeat motif                          | MgCl <sub>2</sub> (mM) | Ta (°C) | Na | Size range (pb) | A <sub>R</sub> |
|------------|-----------------------|--|---------------------------------------|------------------------|---------|----|-----------------|----------------|
| AvE04      | KR534760              | F: AGACGGGCCATACCTAGA<br>R: GATTCTGTGGCACTGC   | (CA) <sub>6</sub>                     | 3.5                    | 55      | 8  | 102-113         | 3.53           |
| AvCl6      | KR534759              | F: GAGGGGCAACCTGTAAC<br>R: TGCACTTAACGAAGTGG   | (TAAC) <sub>3</sub>                   | 3.5                    | 55      | 5  | 196-211         | 2.40           |
| AvG02      | KR534761              | F: ACTTCGACGAAAACCTCT<br>R: ATGGTTGGCATTAAACC  | (TG) <sub>7</sub>                     | 2.7                    | 57      | 6  | 205-214         | 3.64           |
| AvA05      | KR534755              | F: TCCCTACTGCTCATTGGGA<br>R: AAGCGAAACAGGTAAGG | (TG) <sub>7</sub>                     | 2.7                    | 56      | 5  | 205-211         | 2.09           |
| AvA02      | KR534754              | F: ATAGGGATTGGCCCTCAC<br>R: CTTGGGTAGCACAACCTG | (CA) <sub>6</sub> (AATA) <sub>3</sub> | 3.5                    | 55      | 8  | 209-230         | 3.78           |
| AvB03      | KR534756              | F: TACGTGTCCCTGTGGAT<br>R: CCCATTCCTGTCCAGTTG  | (AC) <sub>7</sub>                     | 1.5                    | 56      | 24 | 148-178         | 11.67          |
| AvC01      | KR534757              | F: TTCAGGGTGTCTACATGA<br>R: CTTACGGGGCTAGTAAT  | (TG) <sub>7</sub> (CGTG) <sub>4</sub> | 3.5                    | 59      | 4  | 257-269         | 2.22           |
| AvC08      | KR534758              | F: FGGTGTACGGTTTGGTA<br>R: GCGATACATGCTCAATGC  | (CA) <sub>7</sub>                     | 2.7                    | 59      | 14 | 234-251         | 8.45           |

A<sub>R</sub> is based on the minimum sample size of 12 diploid individuals.

(Peel et al., 2004), both insensitive to heterozygosity. The first is a temporal method based on sequential sampling of different populations (Waples, 1989) while the second is based on linkage disequilibrium (Bartley et al., 1992). The temporal method was run considering the tick samples collected in November 2007 and their parental generation sampled either in May or July. Complementarily, we also applied Balloux (2004)'s method, a method based on heterozygote excess; it is worthy to note that this last estimate *Ne* is sensitive to deviations from HWE since it is directly driven from the Weir and Cockerham (1984)'s *F*<sub>IS</sub> estimator so that  $Ne = 1/(-2F_{IS}) + 1/2(1-F_{IS})$ .

### 3. Results

Eight out of 19 developed markers were retained since they provided reproducible amplification results that were congruent with the expectations under the hypothesis of absence of duplication of the targeted loci. They displayed from 4 to 24 alleles each (Table 1) without any effect of large-alleles dropout. Possible occurrences of stutter bands were nonetheless detected at AvA02 and AvC08 markers.

Only one pair (AvCl6; AvE04) out of the 28 possible pairs of markers showed linkage disequilibrium- i.e., non-random association of genotypes significant at 5% risk ( $P = 0.008$ ). This was not an observation significantly different from that expected by chance under the null hypothesis of statistical independence of the genotypic composition across eight markers (Exact binomial test defined by  $k'$  success = 1,  $k = 28$  attempts and mean  $\alpha = 0.05$ , unilateral test,  $P$ -value = 0.77). Therefore, the eight markers can be reasonably assumed to provide independent information on tick population structure.

No deviation from Hardy Weinberg expectations (HWE) was detected at four markers (AvE04, AvG02, AvA05 and AvC01, Table 2). Significant heterozygote deficits were detected at the other four (AvA02, AvB03, AvCl6 and AvC08;  $P < 0.05$ , Table 2). The AvB03 marker appeared to be X-linked since restricting data to the males resulted in  $F_{IS} \approx 1$  while the  $F_{IS}$  average drawn from females was  $F_{IS} = 0.65$  (range across samples: 0.5 to 1). Therefore, in male ticks, the genotype observed at AvB03 marker was coded either as homozygous when computing statistics insensitive to the correlation between alleles within individuals (i.e., effective population sizes) or as missing data otherwise (i.e., *F*-statistics). Assuming the presence of null alleles was enough to explain the observed heterozygote deficits at three markers (AvA02:  $P = 0.13$ ; AvB03:  $P = 0.15$ ; AvCl6:  $P = 0.12$ ) but not at AvC08 ( $P = 0.004$ ).

The principle component analysis of multi-locus genotypes

supported the existence of two distinct clusters (Fig. 1). The first axis captured a significant part (32.7%,  $P = 0.038$ ) of the total genetic variance; this axis discriminated the samples from the parental generation collected in May and July (on the right in Fig. 1) from those of the offspring generation (collected in November; on the left in Fig. 1).

The estimates in effective population sizes computed from the examination of two successive generations at the eight microsatellite markers ranged from 11 to 23 reproducing ticks per village and generation (see 'temporal method' in Table 3). The 95% confidence intervals (95% CI) of such estimates remained bounded by the extreme of six and 127 reproducing ticks per village (respectively observed at Lamba and Sara; Table 3). Congruent estimates in effective population sizes were provided by the linkage disequilibrium method. For seven of the nine samples, the average estimate in effective population size ranged from 2 to 17 reproducing adults per generation and village and the associated 95% CI remained bounded by finite estimates ( $2 \leq \text{minimum} \leq 11$  and  $4 \leq \text{maximum} \leq 29$ ; Table 3). Two samples were different. The samples collected either in May at Lamba or in July at Sara provided average estimates in effective population sizes about 70 reproducing ticks per village and generation (without a finite upper bound for the 95% CI; Table 3). We tested the sensitivity of such estimates to the set of markers used by re-estimating the effective population sizes with the linkage disequilibrium method after having removed one pair of markers (8 tests performed with the following pair of markers successively removed: AvA02/AvC08, AvB03/AvC08, AvA05/AvG02, AvA02/AvCl6, AvC01/AvE04, AvA02/AvB03, AvC08/AvCl6, AvB03/AvCl6). No changes in the magnitude order of the estimates in effective population sizes was ever noticed (Table 3). Complementarily, the hypothesis of tick effective populations sizes below 20 reproducing adults per village was also supported by Balloux (2004)'s method: the estimates driven on the parental generation collected in either May or July were  $Ne = 5.4$  and 13.4 in Bekuy, 3.0 and 16.9 in Lamba, and 3.5 and 3.6 in Sara; those driven on the offspring generation were  $Ne = 3.2$ , 7.3 and 7.4 in Bekuy, Lamba and Sara, respectively.

### 4. Discussion

Despite a relative abundance of microsatellite markers in *A. variegatum*, the main difficulty encountered was to identify loci that could be amplified specifically (i.e. without any suspicion of locus duplication) and unambiguously genotyped. Eight polymorphic microsatellite markers were characterized in the tropical bont tick *A. variegatum*. Half of them displayed, within cohorts and villages, polymorphism patterns

**Table 2**

**Testing Hardy-Weinberg expectations.** Are detailed for each marker: the number of ticks with non-blank genotypes (N) out of all tick samples genotyped ( $N_{\text{all}}$ ), the observed and expected heterozygosity ( $H_o$  and  $H_e$ , respectively),  $F_{is}$  estimates (per sample and averaged across the nine samples) and the P-values of the exact probability test of Hardy-Weinberg equilibrium. Significant P-values appear in bold; they are underlined when remaining significant after sequential Bonferroni correction (Rice, 1989).

| Marker:  |                  | May           |               |               | July          |               |               | November      |               |               | all samples   |
|----------|------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|          |                  | Bekuy         | Lamba         | Sara          | Bekuy         | Lamba         | Sara          | Bekuy         | Lamba         | Sara          |               |
| AvE04    | N                | 24            | 23            | 25            | 23            | 19            | 23            | 19            | 25            | 19            |               |
|          | $H_o$            | 0.25          | 0.39          | 0.20          | 0.48          | 0.37          | 0.30          | 0.32          | 0.32          | 0.26          |               |
|          | $H_e$            | 0.30          | 0.34          | 0.19          | 0.50          | 0.33          | 0.35          | 0.29          | 0.22          | 0.33          |               |
|          | $F_{is}$         | 0.166         | -0.172        | -0.053        | 0.042         | -0.120        | 0.123         | -0.108        | -0.116        | 0.214         | 0.008         |
|          | P                | 0.3198        | 0.3864        | 0.8042        | 0.7160        | 0.5150        | 0.3972        | 0.6238        | 0.7180        | 0.1909        | 0.48          |
| AvCl6    | N                | 24            | 25            | 24            | 25            | 18            | 23            | 22            | 22            | 21            |               |
|          | $H_o$            | 0.25          | 0             | 0.125         | 0.04          | 0.06          | 0.04          | 0.05          | 0             | 0             |               |
|          | $H_e$            | 0.30          | 0.08          | 0.20          | 0.12          | 0.26          | 0.04          | 0.13          | 0.17          | 0.33          |               |
|          | $F_{is}$         | NA            | 1             | 0.37          | 0.657         | 0.79          | 0             | 0.656         | 1             | 1             | 0.761         |
|          | P                | NA            | <b>0.0218</b> | 0.0680        | 0.0631        | <b>0.0004</b> | 1.0000        | 0.0676        | <b>0.0006</b> | <b>0.0001</b> | <b>0.0001</b> |
| AvG02    | N                | 22            | 24            | 25            | 22            | 18            | 19            | 16            | 24            | 23            |               |
|          | $H_o$            | 0.59          | 0.71          | 0.72          | 0.45          | 0.56          | 0.47          | 0.56          | 0.08          | 0.22          |               |
|          | $H_e$            | 0.48          | 0.54          | 0.53          | 0.45          | 0.46          | 0.40          | 0.46          | 0.08          | 0.20          |               |
|          | $F_{is}$         | -0.238        | -0.325        | -0.378        | -0.01         | -0.219        | -0.178        | -0.222        | -0.022        | -0.068        | -0.222        |
|          | P                | 0.076         | <b>0.0095</b> | <b>0.0072</b> | 0.9830        | 0.1776        | 0.2946        | 0.2030        | 0.9784        | 0.7844        | 1             |
| AvA05    | N                | 24            | 25            | 25            | 21            | 16            | 20            | 20            | 25            | 23            |               |
|          | $H_o$            | 0.08          | 0.16          | 0.12          | 0.19          | 0.25          | 0.25          | 0.05          | 0.04          | 0.04          |               |
|          | $H_e$            | 0.08          | 0.15          | 0.12          | 0.18          | 0.33          | 0.22          | 0.05          | 0.04          | 0.04          |               |
|          | $F_{is}$         | -0.022        | -0.049        | -0.043        | -0.081        | 0.25          | -0.118        | 0             | 0             | 0             | 0.004         |
|          | P                | 0.9814        | 0.8764        | 0.9380        | 0.8560        | 0.2558        | 1             | 1             | 1             | 1             | 0.58          |
| AvA02    | N                | 24            | 24            | 23            | 24            | 19            | 23            | 19            | 22            | 23            |               |
|          | $H_o$            | 0.21          | 0.29          | 0.35          | 0.08          | 0.26          | 0.17          | 0.26          | 0.41          | 0.57          |               |
|          | $H_e$            | 0.57          | 0.30          | 0.57          | 0.47          | 0.57          | 0.08          | 0.69          | 0.58          | 0.65          |               |
|          | $F_{is}$         | 0.637         | 0.036         | 0.396         | 0.827         | 0.545         | 0.669         | 0.625         | 0.295         | 0.133         | 0.473         |
|          | P                | <b>0.0002</b> | 0.7058        | <b>0.0114</b> | <b>0.0001</b> | <b>0.0007</b> | <b>0.0001</b> | <b>0.0001</b> | 0.0902        | 0.3904        | <b>0.0001</b> |
| AvB03    | N                | 16            | 17            | 18            | 18            | 14            | 12            | 13            | 17            | 18            |               |
|          | $H_o$            | 0.13          | 0             | 0.11          | 0.22          | 0.21          | 0.42          | 0.15          | 0.18          | 0.22          |               |
|          | $H_e$            | 0.92          | 0.86          | 0.89          | 0.89          | 0.91          | 0.90          | 0.77          | 0.87          | 0.92          |               |
|          | $F_{is}$         | 0.867         | 1             | 0.879         | 0.756         | 0.771         | 0.547         | 0.821         | 0.801         | 0.764         | 0.808         |
|          | P                | <b>0.0001</b> |
| AvC01    | N                | 22            | 15            | 22            | 25            | 19            | 23            | 20            | 24            | 24            |               |
|          | $H_o$            | 0.14          | 0             | 0.27          | 0.08          | 0.21          | 0.09          | 0             | 0.16          | 0.04          |               |
|          | $H_e$            | 0.13          | 0             | 0.24          | 0.08          | 0.36          | 0.16          | 0             | 0.15          | 0.04          |               |
|          | $F_{is}$         | -0.024        | NA            | -0.135        | -0.021        | 0.426         | 0.47          | NA            | -0.07         | 0             | 0.142         |
|          | P                | 0.9275        | NA            | 1             | 0.9785        | <b>0.0421</b> | 0.1372        | NA            | 0.8699        | 1             | 0.071         |
| AvC08    | N                | 24            | 25            | 25            | 20            | 16            | 17            | 20            | 25            | 22            |               |
|          | $H_o$            | 0.33          | 0.44          | 0.36          | 0.30          | 0.38          | 0.35          | 0.10          | 0.36          | 0.41          |               |
|          | $H_e$            | 0.80          | 0.88          | 0.87          | 0.89          | 0.86          | 0.63          | 0.85          | 0.84          | 0.89          |               |
|          | $F_{is}$         | 0.587         | 0.507         | 0.593         | 0.67          | 0.57          | 0.458         | 0.886         | 0.577         | 0.545         | 0.598         |
|          | P                | <b>0.0001</b> |
| All loci | $N_{\text{tot}}$ | 24            | 25            | 25            | 25            | 19            | 25            | 24            | 25            | 24            |               |
|          | Fis              | 0.479         | 0.375         | 0.38          | 0.489         | 0.446         | 0.365         | 0.557         | 0.506         | 0.49          |               |
|          | P                | <b>0.0001</b> |               |

congruent with Hardy-Weinberg expectations (HWE). A fifth marker was sex-linked while three others displayed heterozygote deficits relatively to HWE that looked mainly caused by the presence of null alleles. The presence of null alleles at microsatellite markers is common in Ixodidae (De Meeùs et al., 2004; Koffi et al., 2006b; Noel et al., 2012; Van Houtte et al., 2013).

Relatively to the parental generation, the offspring generation collected displays a reduced genotypic diversity with corresponding samples apparently clustering together in the principle component analysis (PCA). Given the short distances between the villages involved in study (~10 km), it is possible that domestic hosts from different villages shared some grazing areas at a time when tick larvae searched hosts to attach on. This would promote *A. variegatum* dispersal across villages, reducing thus the among-villages differences in tick genotypic compositions. As signals of host-associated genetic differentiation were reported in other tick-species (De Meeùs et al., 2010; Kempf et al., 2011; McCoy et al., 2005), one may wonder whether or not this could be

involved in the apparent contrast along the PCA first axis between the genotypic composition of *A. variegatum* nymphs (collected on sheep and goats) and that of adults (collected on cattle). This hypothesis can easily be ruled out. For a signal of host-associated genetic divergence to emerge and persist, differences in host-preferences among adults and assortative mating with respect to the host-preferences are minimal requirements which are not fulfilled in *A. variegatum*. Indeed, *A. variegatum* adults usually avoid blood-feeding on sheep and goats. This avoidance is even more pronounced around Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, where the local sheep race (Djallonké race) can host hundreds of *A. variegatum* nymphs without being infested by a single *A. variegatum* adult (Petney et al., 1987). Therefore, the most likely explanation to the contrast in genotypic composition defining the PCA first axis relies on the occurrence of a strong impact of genetic drift from parental to offspring generations (i.e., small effective population sizes). This conclusion was strongly supported by the congruency in the estimates of effective population sizes for *A. variegatum* driven by three estimation

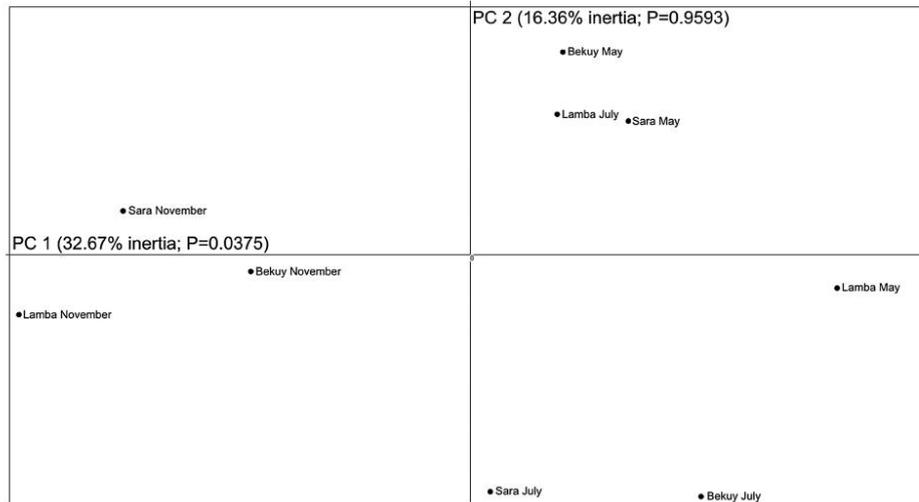


Fig. 1. Principal component analysis (PCA) of multilocus genotypic composition. The first axis explains 32.67% of the total variation ( $p = 0.038$ ).

methods: in all cases, the estimates driven ranged from a few units to a few tens reproducing adults per village and generation.

The  $N_e$  estimates presently driven for *A. variegatum* in Burkina Faso ( $2 \leq N_e \leq 90$  per village) are much lower than those driven for the *R. microplus* ticks feeding on cattle in West Africa ( $N_e \sim 150$  per cattle herd; Biguezoton, 2016) or in the Pacific island of New Caledonia ( $N_e \sim 1000$  per cattle herd; Koffi et al., 2006a; De Meeûs et al., 2010). Let us investigate how the biology of *A. variegatum* can explain such a low estimate in effective population sizes. Could mating patterns provide an explanation? Indeed, one may *a priori* expect uneven reproduction success among *A. variegatum* males despite the field observation of a 1:1 sex-ratio among adults (Stachurski, 2000b). *A. variegatum* females do not attach on host until attached males have started to produce attachment pheromone, so that mating clusters could form around the

most attractive males (Norval and Rechav, 1979). Moreover, as 50% males remain attached for at least 80 days (Barré, 1989), some males could easily mate with many more females than others (Norval et al., 1992). However, the absence of deviations from HWE within *A. variegatum* populations observed at four statistically independent markers does not support the hypothesis of a skewed distribution in male reproductive success. Low effective population sizes are not either due to low fertility since *A. variegatum* females lay up to 20 000 eggs (Barré, 1989; Nuttall, 1915). From then, the only explanation for these small effective population sizes has to be sought on weak survival rates somewhere along the *A. variegatum* life cycle. Such a life-cycle starts with mated and fully-engorged *A. variegatum* females dropping off their host to lay eggs on the ground. After egg-hatching, larvae wait for hosts to attach on by clustering in tight clumps at the tips of grass stems, so

Table 3

Effective population sizes estimates. Estimation of effective population sizes with the linkage disequilibrium method and the temporal based method as described in the text. 95% confidence intervals are presented in brackets. For each method, minimum and maximum values of  $N_e$  obtained on the 8 tests performed by removing 2 markers are presented.

| Location                             | Collection period | 8 markers    | AvB03 and AvC16 removed | AvA02 and AvC08 removed | $N_{e_{min}}$ | $N_{e_{max}}$ |
|--------------------------------------|-------------------|--------------|-------------------------|-------------------------|---------------|---------------|
| <b>Linkage disequilibrium method</b> |                   |              |                         |                         |               |               |
| Bekuy                                | May               | 14 [11 ; 26] | 67 [25 ; ∞]             | 6 [4 ; 9]               | 6             | 78            |
|                                      | July              | 8 [6 ; 10]   | 7 [5 ; 10]              | 5 [4 ; 7]               | 4             | 15            |
|                                      | November          | 4 [3 ; 5]    | 2 [2 ; 3]               | 5 [3 ; 10]              | 1             | 18            |
| Lamba                                | May               | 78 [21 ; ∞]  | 280 [33 ; ∞]            | 102 [18 ; ∞]            | 26            | 322           |
|                                      | July              | 17 [11 ; 29] | 24 [12 ; 110]           | 13 [8 ; 25]             | 11            | 24            |
|                                      | November          | 2 [2 ; 3]    | 22 [11 ; 88]            | 1 [1 ; 1]               | 1             | 22            |
| Sara                                 | May               | 4 [3 ; 4]    | 14 [9 ; 24]             | 2 [1 ; 2]               | 2             | 33            |
|                                      | July              | 67 [23 ; ∞]  | 8 [5 ; 13]              | ∞ [53 ; ∞]              | 2             | 67            |
|                                      | November          | 8 [6 ; 10]   | 6 [4 ; 8]               | 5 [4 ; 7]               | 4             | 13            |
| <b>Temporal based method</b>         |                   |              |                         |                         |               |               |
| Bekuy                                | May-November      | 11 [5 ; 32]  | 16 [5 ; 177]            | 12 [4 ; 60]             | 9             | 22            |
|                                      | July-November     | 8 [4 ; 19]   | 11 [4 ; 51]             | 7 [3 ; 18]              | 7             | 11            |
|                                      | Average           | 14 [7 ; 35]  | 19 [7 ; 118]            | 13 [5 ; 42]             | 12            | 21            |
| Lamba                                | May-November      | 7 [3 ; 14]   | 8 [3 ; 23]              | 5 [2 ; 11]              | 4             | 12            |
|                                      | July-November     | 13 [5 ; 52]  | 16 [5 ; 830]            | 9 [3 ; 31]              | 8             | 19            |
|                                      | Average           | 11 [6 ; 25]  | 13 [5 ; 39]             | 9 [4 ; 21]              | 8             | 18            |
| Sara                                 | May-November      | 20 [8 ; 189] | 18 [5 ; ∞]              | 16 [6 ; 137]            | 9             | 29            |
|                                      | July-November     | 14 [6 ; 64]  | 13 [4 ; 93]             | 15 [5 ; 147]            | 8             | 21            |
|                                      | Average           | 23 [9 ; 127] | 17 [6 ; 92]             | 20 [7 ; 133]            | 9             | 39            |

that many sibs could attach on the same individual-host. From then, the heterogeneous drop-off rhythm of ticks at nymphal and adult stages (Stachurski and Adakal, 2010) coupled with hosts movements ensure two successive rounds of sib re-distributions among the individual-hosts grazing on the same pastures i.e., among infrapopulations (Bush et al., 1997). According to this cycle, low survival rates of any stage present on vegetation (eggs, larvae, nymphs, adults) look as the most parsimonious explanation that will efficiently result in low effective population sizes. In addition, it is noteworthy that extinctions of some *A. variegatum* infrapopulations would also reduce the effective population sizes within communal herds (Criscione and Blouin, 2005), and so, without promoting deviations to HWE given the two rounds of ticks re-distributions among individual-hosts occurring at both nymphal and adult stages.

What is the information provided by such low estimates in effective population sizes in *A. variegatum* regarding the sustainability of tick-control programs in Burkina Faso? The first information concerns the probability of apparition by mutation of a new allele conferring resistance to acaricides. The lowest the effective population size, the lowest is such a probability since the polymorphism resulting from mutation/drift balance is proportional to  $Ne\mu$  with  $\mu$  the mutation rate (e.g. Hartl and Clark, 1997; Hedrick, 2000). The second information relies to the probability that a new allele conferring acaricide resistance may disappear from the tick population before having a chance to be selected for by tick-control programs. The lowest the effective population sizes, the highest the risk that the effect of genetic drift overcomes that of the positive selection resulting from acaricides use (Hartl and Clark, 1997; Hedrick, 2000). Today, the selection pressures caused by acaricide chemical remain rather low in Burkina Faso. Indeed, tick-control programs follow variable strategies (including manual removal and/or application of oil or dung on cattle) in the traditional and low input systems dominating the livestock production there, and, where occurring, chemical-based strategies are mainly achieved through empirical recycling of agricultural pesticides (Adakal et al., 2013). The low  $Ne$  estimates presently driven for the *A. variegatum* effective population sizes in Burkina Faso enhances thus the high probability for the genetic drift to actually overcome the effect of acaricide usages onto the fate of a newly arisen mutant conferring acaricide resistance.

Regarding the evolution of acaricide situation, the situation of *A. variegatum* in Burkina Faso (with  $Ne$  ranging from a few unities to a few tens and  $s$  being weak when non-null) dramatically contrasts with that of the southern cattle tick *R. microplus* in the Pacific island of New Caledonia (with  $Ne \sim 1\ 000$  reproducers per cattle herd and  $s$  intense everywhere along the Western Coast; Koffi et al., 2006a). In the later case, such a high  $Ne$  estimate coupled with low gene flow across cattle herds and homogeneously high selection pressures applied along the West Coast were interpreted as favoring an evolutionary scenario of acaricide resistance due to recurrent events of local positive selection of diverse newly-arisen mutants conferring acaricide resistance rather than an alternative scenario involving the migration among tick populations of a very few resistance mutants (Koffi et al., 2006a). The characterization of the diversity of physiological changes involved in acaricide resistance in these populations allowed testing and confirming this prediction (Chevillon et al., 2007, 2013). The same rationale would indicate a very low probability of both apparition and selection for acaricide resistance mutants in *A. variegatum*, at least in West Africa. Interestingly enough, the absence of reports of acaricide resistance in the *A. variegatum* populations from Guadeloupe or Puerto Rico despite intensive eradication campaigns (Garris and Barré, 1991) may provide some support to such a prediction, even if population genetics studies performed in these New World areas are still required to settle this point.

## 5. Conclusions

We characterized eight microsatellite markers from the tropical

bont tick *A. variegatum*. These markers allowed highlighting very low effective population sizes of the tick populations from Burkina-Faso; a result suggesting that the evolution of acaricide resistance in *A. variegatum* is expected to be much slower than observed in its invasive competitor, *R. microplus*.

## Acknowledgments

This work was supported by the transversal project AAP INRA-CIRAD « Dynamic and genetic diversity of tick populations and transmitted pathogens », the “Chercheur d’Avenir 2011” call from the Languedoc-Roussillon region, France, the Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), and the Ministère de l’Agriculture et de l’Alimentation.

We are indebted to Sébastien Zougrana, Maurice Konkobo and Laurent Kaboré for *A. variegatum* sampling, and to E. Renier and R. Aprelon for technical help. We also wish to thank the members of the group “Ticks and tick-borne diseases” of the “Réseau Ecologie des Interactions Durables” (REID) for useful discussions.

## References

- Adakal, H., Stachurski, F., Chevillon, C., 2013. Tick control practices in Burkina Faso and acaricide resistance survey in *Rhipicephalus geigy* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* 59, 483–491.
- Araya-Anchetta, A., Busch, J.D., Scoles, G.A., Wagner, D.M., 2015. Thirty years of tick population genetics: a comprehensive review. *Infect. Genet. Evol.* 29, 164–179.
- Balloux, F., 2004. Heterozygote excess in small populations and the heterozygote-excess effective population size. *Evolution* 58, 1891–1900.
- Barré, N., 1989. Biologie et écologie de la tique *Amblyomma variegatum* (Acarina : Ixodina) en Guadeloupe (Antilles Françaises). Thèse de Doctorat ès-sciences. Université de Paris-Sud-Orsay, France 268 pp.
- Barré, N., Matheron, G., Rogez, B., Roger, F., Martinez, D., Sheikboudou, C., 1988. *Dermatophilus congolensis* dermatophilosis in cattle in the French West Indies. II. Susceptibility related to the animals. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 41, 339–345.
- Bartley, D., Bagley, M., Gall, G., Bentley, B., 1992. Use of linkage disequilibrium data to estimate effective size of hatchery and natural fish populations. *Conserv. Biol.* 6, 365–375.
- Bezuidenhout, J.D., 1989. *Cowdria Vaccines*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, pp. 31–42.
- Biguezoton, A.S., 2016. Invasion biologique et écologie de la santé vétérinaire - Le cas des communautés de tiques et pathogènes associés au Bénin et au Burkina Faso à l’heure de leur invasion par la tique asiatique du bétail *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Universités Montpellier (France), Abomey-Calavi (Bénin).
- Biguezoton, A., Adehan, S., Adakal, H., Zougrana, S., Farougou, S., Chevillon, C., 2016. Community structure, seasonal variations and interactions between native and invasive cattle tick species in Benin and Burkina Faso. *Parasite. Vector* 9.
- Billotte, N., Lagoda, P.J.L., Risterucci, A.M., Baurens, P.C., 1999. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54, 277–288.
- Brookfield, J.F.Y., 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Mol. Ecol.* 5, 453–455.
- Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M., Shostak, A.W., 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J. Parasitol.* 83, 575–583.
- Chevillon, C., Ducornez, S., de Meeus, T., Koffi, B.B., Gaia, H., Delathiere, J.M., Barré, N., 2007. Accumulation of acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) populations from New Caledonia Island. *Vet. Parasitol.* 147, 276–288.
- Chevillon, C., de Garine-Wichatitsky, M., Barré, N., Ducornez, S., de Meeus, T., 2013. Understanding the genetic, demographical and/or ecological processes at play in invasions: lessons from the southern cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* 59, 203–218.
- Criscione, C.D., Blouin, M.S., 2005. Effective sizes of macroparasite populations: a conceptual model. *Trends Parasitol.* 21, 212–217.
- De Meeus, T., Humair, P.F., Grunau, C., Delaye, C., Renaud, F., 2004. Non-Mendelian transmission of alleles at microsatellite loci: an example in *Ixodes ricinus*, the vector of Lyme disease. *Int. J. Parasitol.* 34, 943–950.
- De Meeus, T., Guégan, J.-F., Teriokhin, A.T., 2009. MultiTest V.1.2, a program to binomially combine independent tests and performance comparison with other related methods on proportional data. *BMC Bioinf.* 10, 443.
- De Meeus, T., Koffi, B.B., Barré, N., de Garine-Wichatitsky, M., Chevillon, C., 2010. Swift sympatric adaptation of a species of cattle tick to a new deer host in New Caledonia. *Infect. Genet. Evol.* 10, 976–983.
- Farougou, S., Kpodekon, M., Tchabode, D., Youssao, A., Boko, C., 2006. Abondance saisonnière des tiques (Acari: Ixodidae) parasites des bovines dans la zone soudanienne du Bénin: cas des départements de l’Atacora et de la Donga. *Ann. Med. Vet.* 150, 52.
- Farougou, S., Kpodekon, M., Tassou, A., 2007. Abondance saisonnière des tiques (Acari: Ixodidae) parasites des bovins dans la zone soudanienne du Bénin: cas des

- départements du Borgou et de l'Alibori. Rev. Afric. Santé Prod. Anim. 5, 61–67.
- Farougou, S., Adakal, H., Biguezont, A., Boko, C., 2012. Prévalence de l'infection d'*Amblyomma variegatum* par *Ehrlichia ruminantium* dans les élevages extensifs du Bénin. Rev. Med. Vet. 163, 261–266.
- Farougou, S., Adakal, H., Boko, C., 2013. Evaluation de la prévalence de la cowdriose chez les ruminants domestiques au Bénin. Rev. Med. Vet. 164, 572–576.
- Garris, G.L., Barré, N., 1991. Acaricide susceptibility of *Amblyomma variegatum* (Acari, Ixodidae) from Puerto-Rico and Guadeloupe. Exp. Appl. Acarol. 12, 171–179.
- Goudet, J., 1995. FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. J. Hered. 86, 485–486.
- Hartl, D.L., Clark, A.G., 1997. Principles of Population Genetics. Sinauer Associates Inc, Sunderland Massachusetts.
- Hedrick, P., 2000. Genetics of Populations. Jones and Bartlett Publishers, Massachusetts.
- Kabore, H., Salembere, M.S., Tamboura, H.H., 1998. Seasonal variation of ticks on cattle in Burkina Faso. In: Jongejans, F., Goff, W., Camus, E. (Eds.), Tropical Veterinary Medicine: Molecular Epidemiology, Hemoparasites and Their Vectors, and General Topics. New York Acad Sciences, New York, pp. 398–401.
- Kempf, F., De Meues, T., Vaumourin, E., Noel, V., Taragel'ova, V., Plantard, O., Heylen, D.J.A., Eraud, C., Chevillon, C., McCoy, K.D., 2011. Host races in *Ixodes ricinus*, the European vector of Lyme borreliosis. Infect. Genet. Evol. 11, 2043–2048.
- Koffi, B.B., de Meues, T., Barré, N., Durand, P., Arnathau, C., Chevillon, C., 2006a. Founder effects, inbreeding and effective sizes in the Southern cattle tick: the effect of transmission dynamics and implications for pest management. Mol. Ecol. 15, 4603–4611.
- Koffi, B.B., Risterucci, A.M., Joulia, D., Durand, P., Barré, N., De Meues, T., Chevillon, C., 2006b. Characterization of polymorphic microsatellite loci within a young *Boophilus microplus* metapopulation. Mol. Ecol. Notes 6, 502–504.
- Koney, E.B.M., Dogbey, O., Walker, A.R., Bell-Sakyi, L., 2004. *Ehrlichia ruminantium* seroprevalence in domestic ruminants in Ghana. II. Point prevalence survey. Vet. Microbiol. 103, 183–193.
- Madder, M., Thys, E., Achi, L., Toure, A., De Deken, R., 2011. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: a most successful invasive tick species in West-Africa. Exp. Appl. Acarol. 53, 139–145.
- Maillard, J., Maillard, N., 1998. Historique du peuplement bovin et de l'introduction de la tique *Amblyomma variegatum* dans les îles françaises des Antilles : synthèse bibliographique. Ethnozootéchnie varia 4, 19–36.
- McCoy, K.D., Chapuis, E., Tirard, C., Boulinier, T., Michalakis, Y., Bohec, C.L., Maho, Y.L., Gauthier-Clerc, M., 2005. Recurrent evolution of host-specialized races in a globally distributed parasite. Proc. Biol. Sci. 272, 2389–2395.
- Noel, V., Leger, E., Gomez-Diaz, E., Risterucci, A.M., McCoy, K.D., 2012. Isolation and characterization of new polymorphic microsatellite markers for the tick *Ixodes ricinus* (Acari, Ixodidae). Acarologia 52, 123–128.
- Norval, R.A.I., Rechav, Y., 1979. Assembly pheromone and its perception in the tick *Amblyomma variegatum* (Acarina, Ixodidae). J. Med. Entomol. 16, 507–511.
- Norval, R.A.I., Andrew, H.R., Yunker, C.E., Burrige, M.J., 1992. Biological processes in the epidemiology of heartwater. In: Fivaz, B., Petney, T., Horak, I. (Eds.), Tick Vector Biology. Medical and Veterinary Aspects. Springer-Verlag, Berlin, pp. 71–86.
- Nuttall, G.H.F., 1915. Observations on the biology of ixodidae. Parasitology 7, 408–456.
- Peel, D., Ovenden, J., Peel, S., 2004. NeEstimator: Software for Estimating Effective Population Size, Version 1.3. Queensland Government, Department of Primary Industries and Fisheries.
- Petney, T.N., Horak, I.G., Rechav, Y., 1987. The ecology of the African vectors of heartwater, with particular reference to *Amblyomma hebraeum* and *Amblyomma variegatum*. Onderstepoort J. Vet. Res. 54, 381–395.
- R. Core Team, R., 2018. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Raymond, M., Rousset, F., 1995. GENEPOP (version 1.2) – population genetics software for exact tests and ecumenicism. J. Hered. 86, 248–249.
- Rice, W.R., 1989. Analyzing tables of statistical tests. Evolution 43, 223–225.
- Rousset, F., 2008. GENEPOP' 007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. Mol. Ecol. Resour. 8, 103–106.
- Rozen, S., Skaletsky, H.J., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S., Misener, S. (Eds.), Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 365–386.
- Stachurski, F., 2000a. Invasion of West African cattle by the tick *Amblyomma variegatum*. Med. Vet. Entomol. 14, 391–399.
- Stachurski, F., 2000b. Modalités de rencontre entre la tique adulte de la tique *Amblyomma variegatum* (Acari, Ixodidae) et les bovins : applications potentielles à la lutte contre ce parasite. Thèse de Doctorat es Sciences. Université de Montpellier II, Montpellier, France 264 pp.
- Stachurski, F., 2006. Attachment kinetics of the adult tick *Amblyomma variegatum* to cattle. Med. Vet. Entomol. 20, 317–324.
- Stachurski, F., 2007. Poor inheritance of low attractiveness for *Amblyomma variegatum* in cattle. Vet. Parasitol. 146, 321–328.
- Stachurski, F., Adakal, H., 2010. Exploiting the heterogeneous drop-off rhythm of *Amblyomma variegatum* nymphs to reduce pasture infestation by adult ticks. Parasitology 137, 1129–1137.
- Stachurski, F., Lancelot, R., 2006. Footbath acaricide treatment to control cattle infestation by the tick *Amblyomma variegatum*. Med. Vet. Entomol. 20, 402–412.
- Stachurski, F., Tortosa, P., Rahajison, P., Jacquet, S., Yssouf, A., Huber, K., 2013. New data regarding distribution of cattle ticks in the south-western Indian Ocean islands. Vet. Res. 44.
- Uilenberg, G., 1983. Heartwater (*Cowdria ruminantium* infection): current status. Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 27, 427–480.
- Uilenberg, G., Camus, E., 1993. Heartwater (cowdriosis). In: Woldehiwet, Z., Ristic, M. (Eds.), Rickettsial and Chlamydial Diseases of Domestic Animals. Pergamon Press, Oxford, United Kingdom, pp. 293–332.
- Van Houtte, N., Van Oosten, A., Jordaens, K., Matthyssen, E., Backeljau, T., Heylen, D., 2013. Isolation and characterization of ten polymorphic microsatellite loci in *Ixodes arboricola*, and cross-amplification in three other *Ixodes* species. Exp. Appl. Acarol. 61, 327–336.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P., 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Mol. Ecol. Notes 4, 535–538.
- Walker, A.R., Bouattour, A., Camicas, J.L., Estrada-Pena, A., Horak, I.G., Latif, A.A., Pegram, R.G., Preston, P.M., 2003. Ticks of Domestic Animals in Africa: A Guide to Identification of Species. Bioscience Reports, Edinburgh.
- Waples, R.S., 1989. A generalized approach for estimating effective population-size from temporal changes in allele frequency. Genetics 121, 379–391.
- Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38, 1358–1370.

RESEARCH

Open Access



# The tree that hides the forest: cryptic diversity and phylogenetic relationships in the Palaearctic vector *Obsoletus/Scoticus* Complex (Diptera: Ceratopogonidae) at the European level

Antoine Mignotte<sup>1,2\*</sup>, Claire Garros<sup>1,2\*</sup>, Laetitia Gardès<sup>1,3</sup>, Thomas Balenghien<sup>1,2,4</sup>, Maxime Duhayon<sup>1,2</sup>, Ignace Rakotoarivony<sup>1,2</sup>, Laura Tabourin<sup>1,2</sup>, Léa Poujol<sup>1,2</sup>, Bruno Mathieu<sup>5</sup>, Adolfo Ibañez-Justicia<sup>6†</sup>, Ahmet Deniz<sup>7†</sup>, Aleksandar Cvetković<sup>8†</sup>, Bethan V. Purse<sup>9†</sup>, David W. Ramilo<sup>10†</sup>, Despoina Stougiou<sup>11†</sup>, Doreen Werner<sup>12†</sup>, Dubravka Pudar<sup>13†</sup>, Dušan Petrić<sup>13†</sup>, Eva Veronesi<sup>14†</sup>, Frans Jacobs<sup>6†</sup>, Helge Kampen<sup>15†</sup>, Isabel Pereira da Fonseca<sup>10†</sup>, Javier Lucientes<sup>16†</sup>, Javier Navarro<sup>17†</sup>, Josue Martinez de la Puente<sup>18,19†</sup>, Jovana Stefanovska<sup>8†</sup>, Kate R. Searle<sup>20†</sup>, Khalid Khallaayoune<sup>4†</sup>, C. Lorna Culverwell<sup>21†</sup>, Magdalena Laska<sup>22†</sup>, Maria Bourquia<sup>2,4†</sup>, Maria Goffredo<sup>23†</sup>, Marina Bisia<sup>11†</sup>, Marion England<sup>24†</sup>, Matthew Robin<sup>25†</sup>, Michela Quaglia<sup>23†</sup>, Miguel Ángel Miranda-Chueca<sup>26†</sup>, René Bødker<sup>27†</sup>, Rosa Estrada-Peña<sup>16†</sup>, Simon Carpenter<sup>24†</sup>, Simona Tchakarova<sup>28†</sup>, Sofia Boutsini<sup>11†</sup>, Ståle Sviland<sup>29†</sup>, Stefanie M. Schäfer<sup>9†</sup>, Zanda Ozoliņa<sup>30†</sup>, Zanda Segliņa<sup>30†</sup>, Zati Vatansever<sup>7†</sup> and Karine Huber<sup>1</sup>

## Abstract

**Background:** *Culicoides obsoletus* is an abundant and widely distributed Holarctic biting midge species, involved in the transmission of bluetongue virus (BTV) and Schmallenberg virus (SBV) to wild and domestic ruminants. Females of this vector species are often reported jointly with two morphologically very close species, *C. scoticus* and *C. montanus*, forming the *Obsoletus/Scoticus* Complex. Recently, cryptic diversity within *C. obsoletus* was reported in geographically distant sites. Clear delineation of species and characterization of genetic variability is mandatory to revise their taxonomic status and assess the vector role of each taxonomic entity. Our objectives were to characterize and map the cryptic diversity within the *Obsoletus/Scoticus* Complex.

**Methods:** Portion of the *cox1* mitochondrial gene of 3763 individuals belonging to the *Obsoletus/Scoticus* Complex was sequenced. Populations from 20 countries along a Palaearctic Mediterranean transect covering Scandinavia to

\*Correspondence: antoine.mignotte@cirad.fr; claire.garros@cirad.fr

†All of the authors participated equally by providing samples

<sup>1</sup> ASTRE, Univ Montpellier, Cirad, INRAE, Montpellier, France

<sup>2</sup> Cirad, UMR ASTRE, 34398 Montpellier, France

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



© The Author(s) 2020. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. 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 in a credit line to the data.

Canary islands (North to South) and Canary islands to Turkey (West to East) were included. Genetic diversity based on *cox1* barcoding was supported by 16S rDNA mitochondrial gene sequences and a gene coding for ribosomal 28S rDNA. Species delimitation using a multi-marker methodology was used to revise the current taxonomic scheme of the *Obsoletus/Scoticus* Complex.

**Results:** Our analysis showed the existence of three phylogenetic clades (*C. obsoletus* clade O2, *C. obsoletus* clade dark and one not yet named and identified) within *C. obsoletus*. These analyses also revealed two intra-specific clades within *C. scoticus* and raised questions about the taxonomic status of *C. montanus*.

**Conclusions:** To our knowledge, our study provides the first genetic characterization of the *Obsoletus/Scoticus* Complex on a large geographical scale and allows a revision of the current taxonomic classification for an important group of vector species of livestock viruses in the Palaearctic region.

**Keywords:** *Culicoides* spp., Cryptic species, Phylogeny, Taxonomy, Species delimitation, Palaearctic Region, Biting midge

## Background

In 2006, northern Europe faced massive outbreaks of bluetongue disease (BTV), a *Culicoides*-borne viral infection which affects wild and domestic ruminants. This was followed by the emergence of Schmallenberg virus (SBV) in 2011, another *Culicoides*-borne virus, which also caused important economic losses for farmers of domestic ruminants [1]. Both, the emergence and massive spread of these diseases over the Palaearctic region raised questions about the vector competence of native Palaearctic biting midges members of the genus *Culicoides* [2, 3]. Quickly following these epizootics, studies confirmed *Culicoides* species of the subgenus *Avaritia* as the most likely vector species and particularly those of the *Obsoletus* group (see below) [3–5]. *Culicoides obsoletus*, *C. scoticus*, *C. dewulfi* and *C. chiopterus* are reported to be implicated in BTV and SBV transmission in Europe based on virus detection or isolation in field-collected populations [6]. Laboratory experimental infections have also confirmed the vector competence of *C. obsoletus* and *C. scoticus*, highlighting species variations in their competence level [7].

The literature defines the *Obsoletus* Group as a group of species with a similar morphology, especially for the characters commonly used for the identification of these insect vectors, namely wing spot pattern (poorly defined spotted wings and a second radial cell with a light spot) and distinctive male genitalia [8–10]. Adults of species in this Group are known to be abundant, widespread across central and northern Europe, and are characterized by long seasonal occurrence [11, 12]. At present, the group is an artificial taxonomic entity still poorly defined, with no real consensus on the included species, with variable internal groupings and naming. Indeed, the world catalogue of *Culicoides* does not account for levels below subgenus and does not identify species complexes as groups [13]. At present, the *Obsoletus* Group is composed of nine valid species: *C. obsoletus* (Meigen), 1818; *C. sinanoensis*

Tokunaga, 1937; *C. scoticus* Downes & Kettle, 1952; *C. montanus* Shakirzhanova, 1962; *C. gornostaevae* Mirzaeva, 1984; *C. abchazicus* Dzhafarov, 1964; *C. filicinus* Gornostaeva & Gachegova, 1972; *C.alachua* Jamnback & Wirth, 1963; and *C. sanguisuga* (Coquillett, 1901). The latter two are the only species belonging to this group exclusively present in the Nearctic region, while the others, are sympatric in the Palaearctic region [8]. *Culicoides obsoletus* is considered Holarctic because it is present in both Nearctic and Palaearctic regions [8]. Combined studies of the geometric morphometry of wings, coupled with molecular analysis have excluded *C. chiopterus* and *C. dewulfi* from the *Obsoletus* Group, despite previously being considered as part of the Group, based only on morphological features [9, 10, 14–16]. Life-cycles and trophic behaviors for most of the species in the *Obsoletus* Group are not well described or vary greatly. For instance, ecological niches of *C. chiopterus* and *C. obsoletus* are suspected to be different, although these two species are phylogenetically very close within the subgenus *Avaritia*. *Culicoides obsoletus* is a widespread generalist species and occupies a wide range of larval habitats such as forest litter, silage residue, tree holes or manure [17]. *Culicoides obsoletus* shows opportunistic trophic preferences and is able to take blood meals on various hosts species (man, sheep, goat, cow, horse or rodent) and, occasionally, on birds [18]. *Culicoides chiopterus* is a more specialist species, found engorged almost exclusively on cattle blood with larvae associated with cattle dung [19, 20].

In addition to the group, Meiswinkel et al. [21], defined the *Obsoletus* Complex to close taxa with very similar female adult morphology, including *C. obsoletus*, *C. montanus* and *C. scoticus*. Several authors have recently reported the existence of cryptic diversity within *C. obsoletus*, namely the *C. obsoletus* clade 'O2' and *C. obsoletus* clade 'O3' in Sweden and Switzerland [15], and the *C. obsoletus* clade 'dark' in the Netherlands [21, 22]. We will use the term "Obsoletus/Scoticus Complex" here to refer

to the cryptic species *C. obsoletus*, *C. scoticus* and *C. montanus* as well as all previously described operational taxonomic units in the literature (see above). The terminology “Obsoletus/Scoticus Complex” is written according to the rules defined by Harbach [23] for infrasubgeneric categories within the genus *Anopheles*. Considering that sympatric cryptic species may exhibit different vector competence and may confound epidemiological investigations, it is mandatory to assess the intra- and interspecific diversity within the Obsoletus/Scoticus Complex.

Given the difficulty of separating these species based on morphological identification, various molecular markers have been used to overcome specific identification problems, including 16S ribosomal DNA [24, 25], 28S ribosomal DNA [26], cytochrome oxidase *b* (*cytb*), the internal transcribed spacer region 1 (ITS1) [27] and ITS2 rDNA [28]. However, the DNA region primarily used to infer phylogenetic relationships in this complex has been the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*cox1*) [29]. Most of the diversity within the Obsoletus/Scoticus Complex has been identified using *cox1* [29–33]. Despite the diversity of markers used to characterize the phylogeny of the complex, few studies have used a multi-marker approach [34]. This study, therefore, will integrate a multi-marker approach in order to strengthen genetic reconstruction of the Obsoletus/Scoticus Complex.

The Obsoletus/Scoticus Complex, as currently presented in the literature, is confused and needs taxonomic revision. We characterized and mapped the genetic diversity of the Obsoletus/Scoticus Complex along a Palearctic-Mediterranean transect covering Scandinavia to Canary islands (North to South) and Canary islands to Turkey (West to East). Our main objectives were to identify and describe the cryptic diversity observed within the Obsoletus/Scoticus Complex over a wide geographical area using molecular analyses and to question the taxonomic status of some newly described clades. In order to achieve these objectives, we conducted a molecular analysis which combined multi-marker sequencing, phylogenetic analyses and species delimitation to explore the genetic diversity of the Obsoletus/Scoticus Complex in the western European portion of the Palearctic region.

## Methods

### *Culicoides* capture and morphological identification

Biting midges were collected at 68 sites located in 20 countries in the western European portion of the Palearctic region, between 2009 and 2017, using national surveillance networks for *Culicoides* populations or local collections (Additional file 1: Table S1). Collections were made overnight with Onderstepoort Veterinary Institute (OVI) light traps set at farms near horses, cattle or sheep and all insects were stored in 70% ethanol. Morphological

identification to the species level of adult *Culicoides* spp. was performed under a binocular microscope using the available identification keys [35, 36].

### DNA extraction, amplification and sequencing

DNA was extracted from a total of 3883 adult females belonging to the Obsoletus/Scoticus Complex using the NucleoSpin® DNA kit RapidLyse (Macherey-Nagel, Duren, Germany), following the manufacturer’s instructions. An additional step was added, before extraction, for all individuals (specimens were ground in 50 µl of 1× PBS buffer). DNA samples are available upon request. Fragments of *cox1* were amplified for the 3883 individuals. After sequence cleaning, 3763 sequences of *cox1* were obtained [dataset *cox1* (1)]. Fragments of 16S and 28S rDNA were amplified on individuals chosen to be representative of the entire species diversity resulting from *cox1* [dataset *cox1* (2)] to reinforce mitochondrial gene sequences. All primer sequences as well as the information relating to them are present in Additional file 2: Table S2. PCR’s were performed in a 25 µl reaction volume. The PCR mix contained 1× Qiagen buffer, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM of each dNTP, 0.2 µM of each primer, 1.25 U Qiagen Taq Polymerase and 0.7 ng/µl genomic DNA for all genes. PCR programs included one-step of 5 cycles before a second step with 35 cycles for 16S rDNA and 28S rDNA. PCR amplification conditions were: an initial denaturation step at 94 °C for 5 min followed by 5 cycles of 94 °C for 30 s; 45 °C for *cox1*, 42 °C for 16S rDNA or 55 °C for 28S rDNA for 40 s; 72 °C for 1 min; 35 cycles of 94 °C for 30 s; 51 °C for *cox1*, 55 °C for 16S rDNA or 50 °C for 28S rDNA for 30 s; 72 °C for 1 min; and a final extension step at 72 °C for 10 min. For each amplification reaction, negative controls were carried out. The PCR products were visualized on 1.5% agarose gels with a GelRed® Nucleic Acid Gel Stain, staining after migration of 90 min at 130 V by electrophoresis for quality control. After purifications, carried out by the sequencing service provider, the remaining 20 µl were sequenced with the same forward primers used for PCR (<https://www.genewiz.com>).

### Sequence analyses

The reference sequences of *cox1* used to identify individuals to species are available in Additional file 3: Table S3. A total of 3763 *cox1* sequences (Additional file 4: Table S4) from female adults morphologically identified as belonging to the Obsoletus/Scoticus Complex were obtained after deletion of short and poor-quality sequences. The *cox1* alignment was used to identify all *Culicoides* to species- or clade-level

within the complex using the reference sequences. Among the reference sequences used to specifically assign our *Culicoides* samples, some sequences previously identified as *C. obsoletus* O1 and O3 [15] were included in our analysis in order to cover the diversity of the clades described in the literature within the *Obsoletus/Scoticus* Complex. After comparison with other sequences, it appears that the sequences named *C. obsoletus* O1 were actually *C. obsoletus* and that *C. obsoletus* O3 belongs to *C. obsoletus* clade dark. For this purpose, *cox1* sequences were aligned with reference sequences [dataset *cox1* (1)]. A phylogenetic tree based on maximum likelihood method allowed designation of a species name to each sequence if the latter belonged to a monophyletic clade with strong support (bootstrap < 900) that included a reference sequence. Thus, *Culicoides* were sequenced for markers *16S* rDNA and *28S* rDNA to support the phylogenetic reconstruction of the complex. All *cox1* [dataset *cox1* (2)], *16S* rDNA and *28S* rDNA sequences were independently aligned with the MUSCLE [37] algorithm available in the software GENEIOUS v.6.0.5 (Biomatters, <http://www.geneious.com>). Genetic diversity indices, haplotype and nucleotide diversity were evaluated using DNASP v.5.10 [38]. Alignments with gaps were cleaned using the software GBLOCKS 0.91b [39]. To assess genetic distance between clades and species within, barcoding gap bar chart using R software was performed with *ggplot2* [40] and *ggthemes* packages. Intra- and interspecific genetic differences based on the Kimura 2-Parameter (K2P) distance model [41, 42] were calculated with MEGAX [43]. In order to map the specific diversity of the *Obsoletus* Group, the R software version 3.6.0 was used with the *Leaflet* version 2.0.2 and *shiny* packages version 1.4.0.

#### Phylogenetic inferences

Phylogenetic trees were constructed for the three markers using maximum-likelihood (ML) and Bayesian inference (BI). Bayesian inference analyses were conducted on MRBAYES version 3.2.6, with tree sampling every 1000 generations in order to calculate posterior probabilities (PP) and 10 million generations. Optimal sequence evolutionary models for each analysis were obtained with Bayesian information criterion (BIC) using jMODELTEST. Maximum-likelihood analyses were conducted on PHYML 3.0. The ML analyses were conducted with the best model selected using 1000 bootstrap replicates for each dataset to investigate the level of support at each node, with starting tree determined by BioNJ analysis. After independent analysis of each gene, alignment of *cox1* and *16S* rDNA were concatenated, and analyzed following ML and BI methods.

#### Species delimitation methods

Two species delimitation methods were applied. The first method was a Bayesian implementation of classical GMYC method, Bayesian General Mixed Yule Coalescent (bGMYC) [44]. The single-locus ultrametric gene trees used for bGMYC methods were created with BEAST 1.8.0 [45] under a strict clock model, a Yule Process Tree Model of speciation, and a random starting tree. This analysis was carried out with default prior distribution, without outgroups and with 10 million generations sampled every 1000 cycles with HKY + G substitution model for *16S* rDNA, and with HKY + I for *28S* rDNA [46]. The software TREEANNOTATOR v1.8.2 was used to find Ultrametric maximum clade credibility (MCC). Single-threshold GMYC analyses were conducted with *splits* package in R.

The second species delimitation method used was the Bayesian Poisson Tree Processes (bPTP) through the web server PTP (<http://species.h-its.org/ptp/>) [47] with 100,000 MCMC generations and a thinning parameter of 100 on a maximum likelihood phylogenetic tree constructed with *cox1* and *16S* rDNA genes concatenated with *C. dewulfi* as outgroup.

## Results

#### Molecular analysis

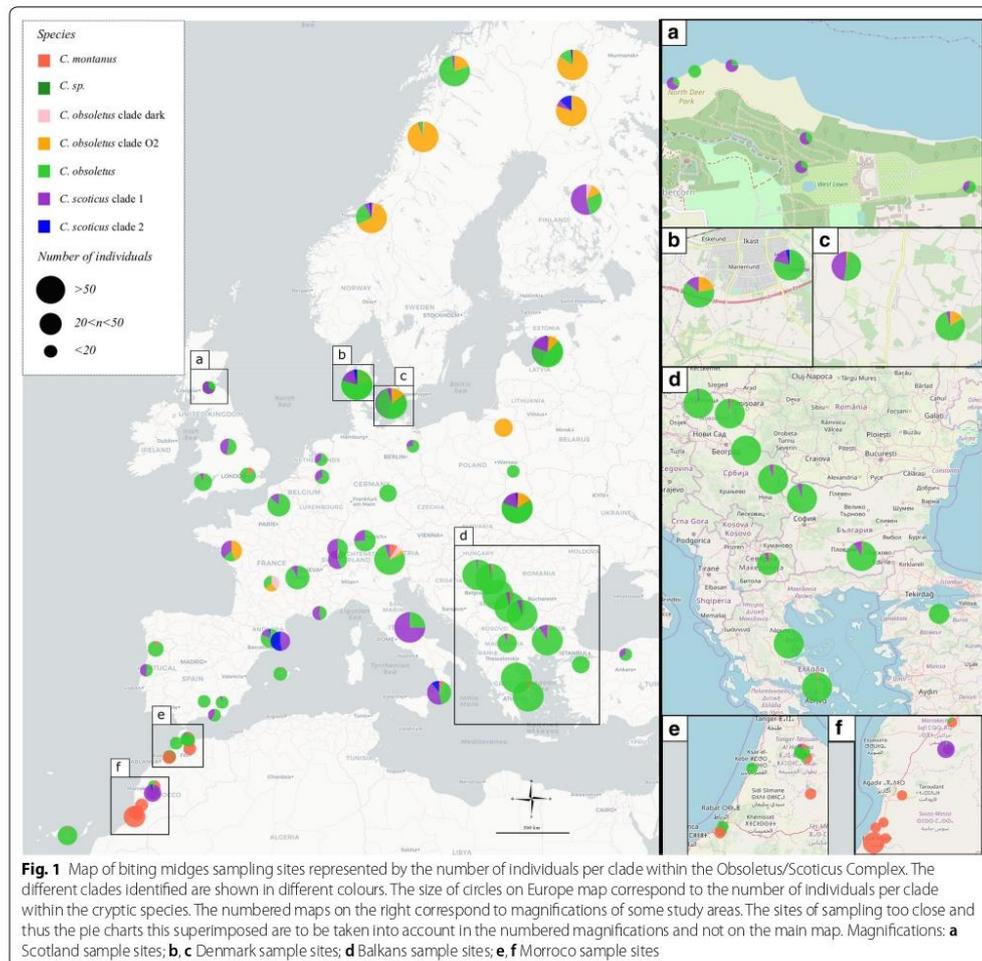
In total, 3763 sequences were obtained for *cox1*, 95 for *16S* rDNA and 95 for *28S* rDNA (Table 1). All sequences were deposited in GenBank (Additional file 4: Table S4). No stop codons, insertions or deletions were found in any of the *cox1* sequences, indicating functional mitochondrial products.

Within the selected samples present in our data set, the most abundant species was *C. obsoletus*, with 2416 individuals sampled, representing 68% of all *Culicoides* caught (Fig. 1). Species diversity within the complex varied according to the latitudes of the sampling sites (Fig. 1). The most sampled species in northern Europe (Norway and Finland) was the *C. obsoletus* clade O2 with 62% (162 individuals) and 58% (147 individuals) of this clade, respectively, in each country. For eastern Europe (Latvia, Poland, Serbia, Bulgaria, Macedonia, Greece and Turkey) the most sampled species was *C. obsoletus*, representing, for example, 99% (162 individuals) of all *Culicoides* sampled in Greece. However, a population in Poland (Wronka) appears to be an exception with 100% (35 individuals) of *C. obsoletus* clade O2. Three individuals, belonging to a phylogenetic clade unidentifiable by our reference sequences close to *C. obsoletus* dark, were reported from Latvia. The latter sequences are identical to sequences present in the BOLD database (accession numbers: GMGRC1056-13, GMGRC1000-13, GMGRD2587-13) of *Culicoides* collected in Bavaria,

**Table 1** Sequence statistics for four gene fragments used to reconstruct the phylogeny of the *Obsoletus/Scoticus* complex

| Dataset          | <i>n</i> | Length (bp) | <i>S</i> | C+G (%) | <i>h</i> | Hd (SD)       | $\pi$ (SD)        | Nucleotide model (under BIC) | Implemented model (BI)           |
|------------------|----------|-------------|----------|---------|----------|---------------|-------------------|------------------------------|----------------------------------|
| <i>cox1</i> (1)  | 3763     | 512–627     | 141      | 34.5    | 228      | 0.890 (0.003) | 0.06299 (0.00473) |                              |                                  |
| <i>cox1</i> (2)  | 95       | 528–623     | 146      | 33.7    | 77       | 0.994 (0.003) | 0.0921 (0.00489)  | TPM2uf+I+G                   | <i>nst</i> = 6; rates = invgamma |
| 16S rDNA         | 95       | 263         | 51       | 15.8    | 13       | 0.851 (0.02)  | 0.04791 (0.00446) | HKY+G                        | <i>nst</i> = 2; rates = gamma    |
| 28S rDNA         | 95       | 576         | 25       | 39.8    | 24       | 0.911 (0.015) | 0.00753 (0.00099) | HKY+I                        | <i>nst</i> = 2; rates = propinv  |
| Concatened genes | 95       | 731         | 197      | 32.8    | 90       | 0.998 (0.002) | 0.04594 (0.00297) | TPM2uf+I+G                   | <i>nst</i> = 6; rates = invgamma |

**Abbreviations:** *n*, number of individuals; *h*, number of haplotypes; Hd, haplotype (gene) diversity;  $\pi$ , nucleotide diversity; *S*, number of polymorphic sites; SD, standard deviation; bp, base pairs; BIC, Bayesian information criterion; BI, Bayesian inference



Germany. Finally, western and central Europe (Portugal, Spain, UK, France, Italy, Netherlands, Germany, Switzerland and Denmark) had the higher species diversity of all the species found in the Palaearctic transect. The most sampled species within this area was *C. obsoletus* with 913 individuals, representing 64% of the *Culicoides* sampled. However, unlike in eastern Europe, *C. scoticus* clade 1 was also found in significant numbers with 386 individuals, or 27% of the samples. *Culicoides obsoletus* clade dark was rarely reported in Europe with only 26 individuals found in France, Denmark, Finland, Italy, Latvia, Norway and Switzerland. *Culicoides montanus* was found in relatively high proportion in Morocco with 54% (80 individuals) of samples, whereas it was much rarer and more sporadic in European countries.

A total of 228 different *cox1* haplotypes were identified. Haplotype diversity varied from 0.829 for *C. obsoletus* clade O2 to 0.517 for *C. scoticus* clade 1 and *C. obsoletus* clade dark (Table 2). In accordance with mitochondrial genes in insects [48], the GC composition ranged from 16% for *16S* rDNA alignment to 39.8% for *28S* rDNA, with a strong AT bias (Table 2). *Culicoides obsoletus* showed very high intraspecific diversity with 94 different haplotypes, representing nearly 43% of the total haplotypic diversity encountered in this study. The maximum interspecific genetic distance (Fig. 2) was reached between *C. dewulfi* and other taxonomic units, with a minimum of 17% of genetic distance between this outgroup and all other members inside the complex. *Culicoides dewulfi* is used here as an outgroup. Genetic distances of the same level as the other intraspecific distances were observed between *C. scoticus* clade 1 and *C. scoticus* clade 2, and between *C. obsoletus* and *C. montanus*, with a maximum of 2% and 4%, respectively. Similar interspecific genetic distances, were observed between all the other clades within the complex, with a minimum of 8% distance. All species had mean intraspecific distances of less than 1%, other than *C. scoticus* clade 2.

Among the 228 unique *cox1* haplotypes, 95 were selected to represent the specific diversity of the complex. Using the same individuals, two alignments of 95 sequences of *16S* rDNA (Additional file 5: Figure S1.) and *28S* rDNA were constructed. In order to compare tree topology and to concatenate markers, a second *cox1* alignment of the 95 sequences was performed (Additional file 6: Figure S2.). The *cox1* dataset had a greater haplotype diversity than *16S* rDNA and *28S* rDNA datasets, with 0.994 vs 0.851 and 0.911 respectively. *28S* rDNA was more monomorphic than *cox1* and *16S* rDNA, with 25, 146 and 51 polymorphic sites, respectively.

#### Phylogenetic analysis

Information on the alignments used for the construction of phylogenetic trees is provided in Table 1. Species with confirmed taxonomic validity (*C. montanus*, *C. obsoletus* and *C. scoticus*) and cryptic taxa (*C. obsoletus* clade O2, *C. obsoletus* clade dark) highlighted by previous studies were strongly supported (bootstrap > 90%) (Fig. 3). *Culicoides obsoletus* clade O2 constituted a monophyletic clade with strong support (bootstrap > 90%). *Culicoides obsoletus* and *C. montanus* formed a monophyletic clade. *Culicoides scoticus*, another species considered valid, showed two phylogenetic clades, i.e. *C. scoticus* clade 1 and *C. scoticus* clade 2. A monophyletic clade close to *C. obsoletus* clade dark, was strongly supported by bootstrap values. Topologies of phylogenetics trees constructed *via* maximum likelihood (Fig. 3a) and Bayesian inference (BI) analyses (Fig. 3b) were congruent for alignment of full haplotype diversity.

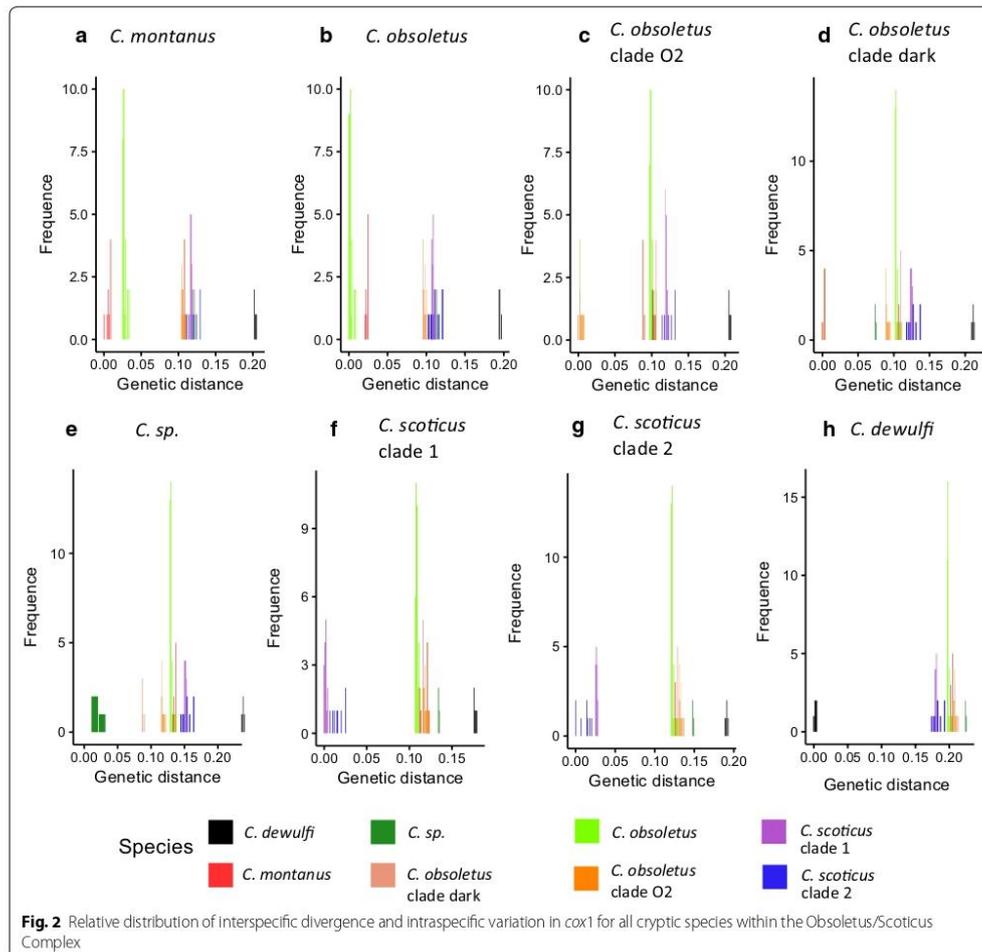
#### Species delimitation

Using the *cox1* dataset and bGMYC method for species delimitation (Fig. 4), 6 molecular operational taxonomic units (MOTUs) were observed: *C. montanus*, *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. obsoletus* clade O2, *C. obsoletus* clade dark and *Culicoides* sp. within the Obsoletus/Scoticus Complex. Based on the *16S* rDNA

**Table 2** Genetic diversity indices for mitochondrial *cox1* gene segment of *Culicoides* spp. in the Obsoletus/Scoticus Complex

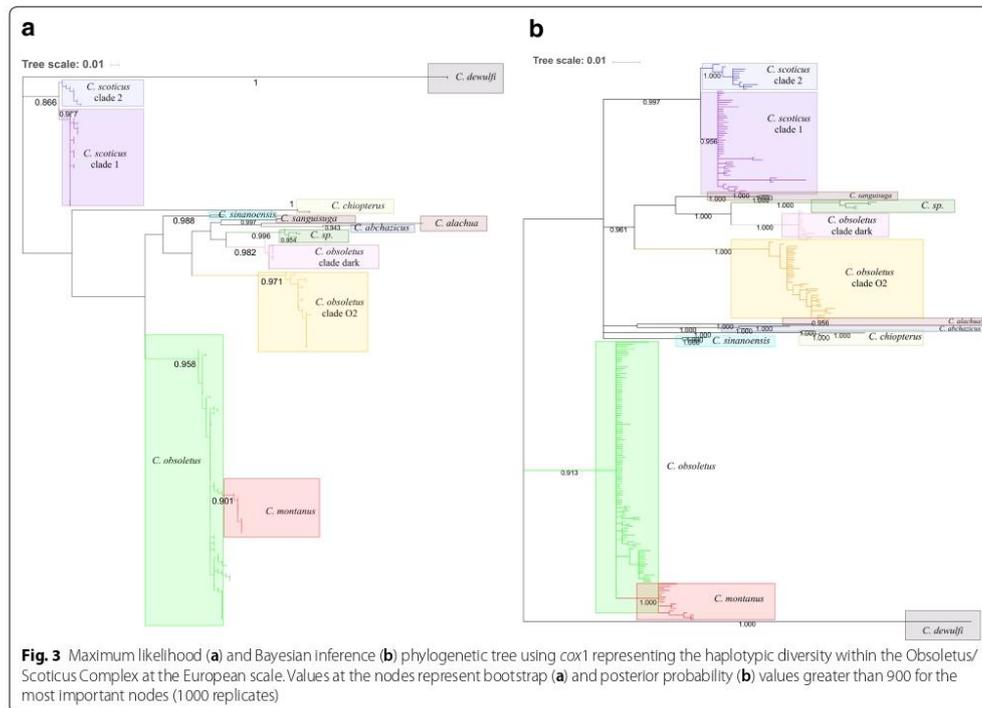
| Species                        | n    | h   | Hd (SD)       | $\pi$ (SD)        | S  | C+G (%) |
|--------------------------------|------|-----|---------------|-------------------|----|---------|
| <i>C. montanus</i>             | 106  | 13  | 0.642 (0.039) | 0.00726 (0.00317) | 66 | 0.334   |
| <i>C. obsoletus</i>            | 2416 | 106 | 0.773 (0.005) | 0.00450 (nd)      | 72 | 0.324   |
| <i>C. obsoletus</i> clade O2   | 512  | 38  | 0.829 (0.012) | 0.00447 (nd)      | 53 | 0.310   |
| <i>C. obsoletus</i> clade dark | 26   | 6   | 0.517 (0.113) | 0.00191 (0.00058) | 7  | 0.315   |
| <i>Culicoides</i> sp.          | 3    | 2   | 0.667 (0.314) | 0.00749 (0.00353) | 6  | 0.331   |
| <i>C. scoticus</i> clade 1     | 645  | 61  | 0.562 (0.023) | 0.00463 (nd)      | 93 | 0.347   |
| <i>C. scoticus</i> clade 2     | 55   | 12  | 0.753 (0.046) | 0.00499 (0.00093) | 16 | 0.328   |

Abbreviations: n, number of individuals; h, number of haplotypes; Hd, haplotype (gene) diversity;  $\pi$ , nucleotide diversity; nd, not determined; S, number of polymorphic sites; SD, standard deviation



dataset analysed with the same delimitation method, three MOTUs were characterised including (i) two clades within *C. scoticus*; (ii) *Culicoides* sp., *C. obsoletus* clade dark and *C. obsoletus* clade O2; and (iii) *C. obsoletus* and *C. montanus*. Species delimitation with the 28S rDNA and 16S rDNA dataset had a lower resolution compared to *cox1*. The 28S rDNA and 16S rDNA datasets were invaluable in identifying cryptic diversity within the Obsoletus/Scoticus Complex. Indeed, the tree generated with the 28S rDNA dataset showed very low polymorphisms and resolution signal (Additional

file 7: Figure S3.). The bPTP method was conducted on concatenated dataset of *cox1* and 16S rDNA genes. The best statistical support for species delimitation was for concatenated dataset with bPTP. MOTUs found with the concatenated alignment and *cox1* were the same, except for the delimitation of *C. montanus* and *C. obsoletus*. Indeed, using molecular delineation based on bPTP analysis, MOTUs were observed for *C. scoticus*, *C. obsoletus* clade O2, *C. obsoletus* clade dark, and *Culicoides* sp. Using the bPTP method we were not able to distinguish *C. obsoletus* and *C. montanus* as well as



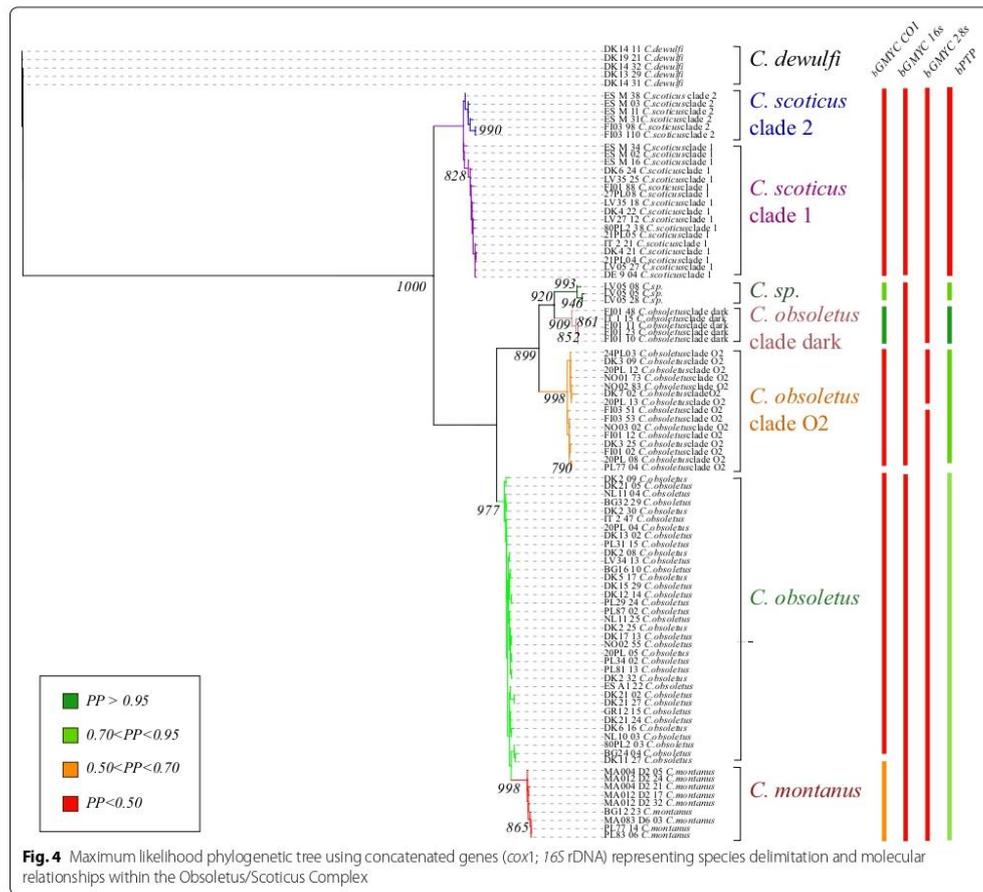
*C. scoticus* clades 1 and 2, which were not classified as separate species by either method.

### Discussion

Our study investigated the genetic diversity of the Obsoletus/Scoticus Complex at the European level (68 sampling sites across 20 Palaeartic countries with 3763 *cox1* sequences). For the first time, the sample selection covers the whole known western Palaeartic distribution area of these species. The complementary use of the mitochondrial *16S* rDNA and nuclear *28S* rDNA genes confirms the important level of cryptic diversity found within the Obsoletus/Scoticus Complex. Indeed species delimitation methods allowed us to delineate five MOTUs and: (i) to provide evidence of the taxonomic validity of *C. obsoletus* clade O2 and *C. obsoletus* clade dark (ii) to identify individuals belonging to a species not yet described or not present into the databases; and (iii) to question the taxonomic status of *C. montanus*.

Species assignment at the European scale showed variation in the distribution of the cryptic diversity of

Obsoletus/Scoticus Complex. This result confirmed a previous study by Möhlmann et al. [49], who found a strong latitudinal effect on the relative abundance of species of the Obsoletus/Scoticus Complex. However, the previous study was carried out with few individuals from a relatively small number of countries and sampling sites [49]. This contrasts with our study, the first to be conducted at a European scale with a large data set sufficient to provide a more precise idea of the cryptic diversity within the Obsoletus/Scoticus Complex. The latitudinal variation in the relative abundance of the different cryptic species in the Obsoletus/Scoticus Complex, could be due to a wide range of factors like different ecological niches, or differences in the availability of hosts and breeding sites [50]. For example, a study conducted in Italy showed that *C. scoticus* collection sites were dominated by areas of natural vegetation or forest, at medium altitudes, preferably in wilder and more pristine environments [51]. However, the heterogeneity of *Culicoides* collection dates may also explain these variations in specific diversity within the complex. For instance, a study conducted in



Sweden, found a seasonal variation in *Culicoides* community structure [52]. The omnipresence of *C. obsoletus* makes it the dominant species in Europe, confirming its status as a generalist species, which tolerates a wide range of eco-climatic conditions. The dominant species also varies according to geographical location. For example, *C. obsoletus* clade O2 is the most sampled species in Nordic countries while *C. montanus* prevails in Morocco. France, Italy and Spain appear to have the highest specific diversity of *Culicoides* belonging to the Obsoletus/Scoticus Complex. These three countries bring together all the cryptic diversity known so far, except the new, unidentified, *Culicoides* taxon that has only been found in Latvia regarding our dataset. This could be due to the significant

diversity of ecological niches as well as the high density of hosts in these countries and this species diversity variation is in line with general patterns of latitudinal increase in species richness [53].

Our phylogenetic analysis allowed us to define seven well supported phylogenetic clades. Some of them correspond to species with taxonomic validity (*C. montanus*, *C. obsoletus* and *C. scoticus*), some more recently described phylogenetic clades (*C. obsoletus* clade dark and *C. obsoletus* clade O2) [52, 54] and some clades never described before (*Culicoides* sp. and *C. scoticus* clade 2).

Without taking into account *C. scoticus*, the phylogenetic reconstruction produced herein, confirmed the presence of two divergent groups; one consisting of

*C. obsoletus* and *C. montanus* and the other of *C. obsoletus* clade dark, *C. obsoletus* clade O2 and a clade not yet described in the literature. We were unable to identify these sequences due to the absence of reference sequences identified at the species level in the sequence databases. However, three sequences, from specimens collected in Bavaria in Germany, present in the BOLD database are identical. Further sampling and sequencing of *Culicoides* from eastern Europe are necessary in order to associate morphological features with this new cryptic species. The large number of *Culicoides* processed during this study made it difficult to use non-destructive DNA extraction techniques. Non-destructive techniques would be necessary to couple morphological criteria with genetic analysis, in order to identify this species.

We also described a second clade phylogenetically very close to *C. scoticus*, *C. scoticus* clade 2 [55]. However, given the small genetic distance observed between these two clades, they can be considered as intraspecific variation within *C. scoticus*.

According to this study, *C. obsoletus* clade dark appears as a true cryptic species, with high phylogenetic support. Meiswinkel et al. [21] hypothesized that *C. obsoletus* clade dark could be *C. gornostaevae* Mirzaeva, 1984, but *C. gornostaevae* was significantly larger and had a distribution restricted to the boreal zone of Siberia. However, this species has been recently reported from Norway, Poland and Sweden [56] but the lack of *C. gornostaevae* reference sequences in publicly available databases prevented comparisons with *C. obsoletus* clade dark.

*Culicoides obsoletus* clade O2 was also strongly supported by phylogenetic and species delimitation analysis, and thus could be considered a cryptic species within the *Obsoletus/Scoticus* Complex. However, our sample showed a high abundance of *C. obsoletus* clade O2 mainly at high latitudes, whereas it had initially been identified for the first time further south in the Swiss Alps [54, 56, 57] and France.

Little is known about the ecology of *C. montanus*. We found this species over a large geographical area, from Morocco to a few individuals in Norway. In spite of this, we have identified only a very small number of *C. montanus* except in Morocco where this species constitutes the majority. This latter result is in accordance with the fact that sites in Italy, where *C. montanus* is predominant are characterised by a high land surface temperature, higher than the values registered in the *C. obsoletus* and *C. scoticus* sites [51]. *Culicoides obsoletus* and *C. scoticus* are considered to be sibling species because of diagnostic female morphological characters, which are difficult to observe or overlap [16], as opposed to the morphological identification of males which is simpler [58]. If the genetic analyses

by Pages & Sarto [58] confirm that both *C. obsoletus* and *C. scoticus* are distinct species, the question remains open for *C. montanus*. Previous phylogenetic studies based on *cox1* indeed showed limited genetic distance between *C. obsoletus* and *C. montanus* and in studies based on ITS sequences *C. montanus* always appears in one of the subclades of *C. obsoletus* [59]. In our multi-marker phylogenetic tree, *C. montanus* and *C. obsoletus* formed a monophyletic clade. In addition, the genetic distance between *C. obsoletus* and *C. montanus* was of the same order of magnitude as some intraspecific distances.

The number of putative species defined within the *Obsoletus/Scoticus* Complex varied depending on the molecular markers and species delimitation methods used (Fig. 4), particularly pertaining to the status of *C. obsoletus* and *C. montanus*. Unlike the other methods, the bGMyc method, based on *cox1*, distinguished these two species. This can be explained by the fact that some parameters of the analysis (i.e. priors), like differences in population size or speciation rates, can bias the GMyc method by overestimating the number of species [46, 60–62]. Insufficient sampling, high gene flow or a recent speciation event are also likely explanations for the differences in results between phylogenetic trees and species delimitation results [63, 64]. Although subject to the same constraints, it has been shown that the bPTP method is significantly more robust [65]. Moreover, methods based on multiple loci improve discovery, resolution and stability of species delimitation [66, 67]. Furthermore, studies have shown that species delineation in insects is more appropriate with multilocus species delimitation methods [68–71]. These arguments allowed us to validate the species delimitation scheme produced with the bPTP method. This analysis coupled with the low level of genetic distances observed between *C. montanus* and *C. obsoletus* led us to question the taxonomic status of *C. montanus*. This could be the beginning of a speciation process of *C. montanus* within the clade of *C. obsoletus*. However, *C. montanus* was originally described from Kazakhstan and present in central Asia [57]. Therefore, examination of individuals sampled in this geographical area could strengthen our conclusions.

In the light of our conclusions, in-depth morphological analyses with the deposition of reference individuals will have to be carried out in order to decide whether or not to definitively rule out the taxonomic status of the cryptic species making up this complex. Indeed, although adult females are not morphologically distinguishable on a routine basis, males are easier to identify using their genitalia and pupal differences and can provide evidence of morphological differences between the species.

## Conclusions

This study provides clarification of the distribution pattern of species belonging to the *Obsoletus/Scoticus* Complex, using a dataset based on samples from western Palaearctic and Mediterranean transect. Strong variations in latitudinal cryptic species diversity was observed. This study clarifies the phylogenetic relationships between species belonging to the *Obsoletus/Scoticus* Complex. We identified and validated five MOTUs, *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. obsoletus* clade O2, *C. obsoletus* clade dark and a MOTU corresponding to an unidentified species. The latter three species have not been formally described but our results confirm that they should be considered as species in their own right. More detailed studies of their morphology and ecology are needed to provide more detailed descriptions of these species. Furthermore, our results raise questions concerning the taxonomic status of *C. montanus*, which was previously considered as a taxonomically valid species.

## Supplementary information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04114-1>.

**Additional file 1: Table S1.** Information on adult female *Culicoides* sampling sites and results of specific assignment using *cox1*.

**Additional file 2: Table S2.** Primers used for PCRs and sequencing in this study.

**Additional file 3: Table S3.** Reference sequences used for specific assignment.

**Additional file 4: Table S4.** Information on all *Culicoides* sequenced and GenBank accession numbers.

**Additional file 5: Figure S1.** Maximum likelihood phylogenetic tree using 16S rDNA. Values at the nodes represent bootstrap values greater than 800 for the most important nodes (1000 replicates).

**Additional file 6: Figure S2.** Maximum likelihood phylogenetic tree using *cox1*. Values at the nodes represent bootstrap values greater than 800 for the most important nodes (1000 replicates).

**Additional file 7: Figure S3.** Maximum likelihood phylogenetic tree using 28S rDNA. Values at the nodes represent bootstrap values greater than 800 for the most important nodes (1000 replicates).

## Abbreviations

BTv: bluetongue virus; SBV: Schmallenberg virus; *cytb*: cytochrome oxidase b; ITS1: internal transcribed spacer region 1; ITS2: internal transcribed spacer region 2; *cox1*: cytochrome c oxidase subunit 1; N: number of individuals; h: number of haplotypes; Hd: haplotype (gene) diversity;  $\pi$ : nucleotide diversity; nd: not determined; S: number of polymorphic sites; bGMYC: Bayesian General Mixed Yule Coalescent; MOTUs: molecular operational taxonomic units; bPTP: Bayesian Poisson Tree Processes.

## Acknowledgements

The authors are grateful to all European partners who assisted in *Culicoides* sampling and shipping. We acknowledge Bruno Mathieu for his friendly cooperation and for allowing us access to use some of his sequences as references for our study.

## Authors' contributions

AM, KH and CG designed the study. AJJ, AD, AC, BVP, DWR, DS, DW, DPu, DPe, EV, FJ, HK, IPF, JL, JN, JMP, JS, KRS, KK, CLC, ML, MBo, MG, MBi, ME, MR, MO,

MAMC, RB, REP, SC, ST, SB, SS, SMS, ZO, ZS and ZV provided samples of *Culicoides* collected in their respective countries. IR, MD contributed the identification of *Culicoides*. AM, LG, LP and LT performed DNA extraction, amplification, quality control and sequencing. BM provided some sequences as references for our study. AM analysed the data. KH and CG contributed to the manuscript written first by AM. All authors read and approved on the final manuscript.

## Funding

This study was partially funded by the EU grant H2020-727393 PALE-BLU and by the VectorNet project (OC/EFSa/AHAW/2013/02-FWC1) funded by the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) and the European Food Safety Authority (EFSA). The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission, of the ECDC or of the EFSA.

## Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this published article and its additional files. The newly generated sequences were submitted in the GenBank database under the accession numbers MT170026-MT173788.

## Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

## Consent for publication

Not applicable.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Author details

<sup>1</sup> ASTRE, Univ Montpellier, Cirad, INRAE, Montpellier, France. <sup>2</sup> Cirad, UMR ASTRE, 34398 Montpellier, France. <sup>3</sup> Cirad, UMR ASTRE, 97170 Petit-Bourg, Guadeloupe, France. <sup>4</sup> Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Unité Parasitologie et Maladies Parasitaires, 10100 Rabat, Morocco. <sup>5</sup> Institute of Parasitology and Tropical Pathology of Strasbourg, Université de Strasbourg, DIHP UR 7292, 67000 Strasbourg, France. <sup>6</sup> Centre for Monitoring of Vectors, National Reference Centre, Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority, Wageningen, The Netherlands. <sup>7</sup> Veterinary Control Central Research Institute, Ankara, Turkey. <sup>8</sup> Department of Parasitology and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Ss. Cyril and Methodius University in Skopje, Skopje, Republic of North Macedonia. <sup>9</sup> Centre for Ecology, Centre for Ecology & Hydrology, Wallingford OX10 8BB, UK. <sup>10</sup> CISA-Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Avenida da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa, Portugal. <sup>11</sup> Department of Parasitology-Parasitic Diseases, Entomology & Bee Health, Veterinary Centre of Athens, Athens, Greece. <sup>12</sup> Leibniz-Centre for Agricultural Landscape Research, Müncheberg, Germany. <sup>13</sup> Faculty of Agriculture, University of Novi Sad, Novi Sad, Serbia. <sup>14</sup> National Centre for Vector Entomology, Institute of Parasitology, University of Zürich, Zürich, Switzerland. <sup>15</sup> Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Greifswald, Germany. <sup>16</sup> Department of Animal Pathology, AgriFood Institute of Aragón (IA2) Veterinary Faculty, 50013 Zaragoza, Spain. <sup>17</sup> Departamento de Microbiología, Laboratorio de Producción y Sanidad Animal de Granada, Junta de Andalucía, Granada, Spain. <sup>18</sup> Doñana Biological Station, CSIC, Sevilla, Spain. <sup>19</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain. <sup>20</sup> Centre for Ecology & Hydrology, Edinburgh OX10 8BB, UK. <sup>21</sup> Department of Virology, University of Helsinki, Medicum, Haartmaninkatu 3, Helsinki 00014, Finland. <sup>22</sup> National Veterinary Research Institute, Pulawy, Poland. <sup>23</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise 'G. Caporale', Campo Boario, 64100 Teramo, Italy. <sup>24</sup> The Pirbright Institute, Pirbright, UK. <sup>25</sup> Department of Epidemiology and Population Health, Institute of Infection and Global Health, University of Liverpool, Leahurst, Chester High Road, Neston, Cheshire CH64 7TE, UK. <sup>26</sup> Applied Zoology and Animal Conservation Research Group, University of the Balearic Islands UIB, Palma, Spain. <sup>27</sup> University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark. <sup>28</sup> National Diagnostic and Research Veterinary Medical Institute, Sofia, Bulgaria. <sup>29</sup> Norwegian Veterinary Institute, Oslo, Norway. <sup>30</sup> Institute of Food safety, Animal Health and Environment 'BIOR', Riga, Latvia.

Received: 13 January 2020 Accepted: 29 April 2020  
Published online: 20 May 2020

## References

- Carpenter S, Groschup MH, Garros C, Felipe-Bauer ML, Purse BV. *Culicoides* biting midges, arboviruses and public health in Europe. *Antiviral Res.* 2013;100:102–13.
- Wilson AJ, Mellor PS. Bluetongue in Europe: past, present and future. *Phil Trans R Soc Lond B.* 2009;364:2669–81.
- Carpenter S, Wilson A, Mellor PS. *Culicoides* and the emergence of bluetongue virus in northern Europe. *Trends Microbiol.* 2009;17:172–8.
- Hoffmann B, Eschbaumer M, Beer M. Real-time quantitative reverse transcription-PCR assays specifically detecting bluetongue virus serotypes 1, 6, and 8. *J Clin Microbiol.* 2009;47:2992–4.
- Savini G, MacLachlan NJ, Sanchez-Vizcaino JM, Zientara S. Vaccines against bluetongue in Europe. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2008;31:101–20.
- Carpenter S, Lunt HL, Arav D, Venter GJ, Mellor PS. Oral susceptibility to bluetongue virus of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from the United Kingdom. *J Med Entomol.* 2006;43:73–8.
- Carpenter S, McArthur C, Selby R, Ward R, Nolan DV, Luntz AJ, et al. Experimental infection studies of UK *Culicoides* species midges with bluetongue virus serotypes 8 and 9. *Vet Rec.* 2008;163:589–92.
- Mathieu B. 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. Ecole doctorale Sciences de la vie et de la santé Université de Strasbourg; 2011.
- Meiswinkel R, Gomulski LM, Delecolle JC, Goffredo M, Gasperi G. The taxonomy of *Culicoides* vector complexes—unfinished business. *Vet Ital.* 2004;40:151–9.
- Hajd Henni L, Sauvage F, Ninio C, Depaquit J, Augot D. Wing geometry as a tool for discrimination of *Obsoletus* group (Diptera: Ceratopogonidae: *Culicoides*) in France. *Infect Genet Evol.* 2014;21:110–7.
- Mehlhorn H, Walldorf V, Klimpel S, Jahn B, Jaeger F, Eschweiler J, et al. First occurrence of *Culicoides obsoletus*-transmitted bluetongue virus epidemic in central Europe. *Parasitol Res.* 2007;101:219–28.
- Savini G, Goffredo M, Monaco F, Di Gennaro A, Cañero MA, Baldi L, et al. Bluetongue virus isolations from midges belonging to the *Obsoletus* complex (*Culicoides*, Diptera: Ceratopogonidae) in Italy. *Vet Rec.* 2005;157:133–9.
- Borkent A. World species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). *Salmon Ann: American Museum of Natural History, and Instituto Nacional de Biodiversidad.* 2016.
- Gomulski LM, Meiswinkel R, Delecolle JC, Goffredo M, Gasperi G. Phylogenetic relationships of the subgenus *Avaritia* Fox, 1955 including *Culicoides obsoletus* (Diptera, Ceratopogonidae) in Italy based on internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Syst Entomol.* 2005;30:619–31.
- Ander M, Troell K, Chirico J. Barcoding of biting midges in the genus *Culicoides*: a tool for species determination. *Med Vet Entomol.* 2013;27:323–31.
- Kluiters G, Pages N, Carpenter S, Gardes L, Guis H, Baylis M, et al. Morphometric discrimination of two sympatric sibling species in the Palaearctic region, *Culicoides obsoletus* Meigen and *C. scoticus* Downes & Kettle (Diptera: Ceratopogonidae), vectors of bluetongue and Schmallenberg viruses. *Parasit Vectors.* 2016;9:262.
- Ninio C, Augot D, Delecolle JC, Dufour B, Depaquit J. Contribution to the knowledge of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) host preferences in France. *Parasitol Res.* 2011;108:657–63.
- Martinez-de la Puente J, Figuerola J, Soriguier R. Fur or feather? Feeding preferences of species of *Culicoides* biting midges in Europe. *Trends Parasitol.* 2015;31:16–22.
- Garros C, Gardes L, Allene X, Rakotoarivony I, Viennet E, Rossi S, et al. Adaptation of a species-specific multiplex PCR assay for the identification of blood meal source in *Culicoides* (Ceratopogonidae: Diptera): applications on Palaearctic biting midge species, vectors of Orbiviruses. *Infect Genet Evol.* 2011;11:103–10.
- Kettle DS, Lawson JWH. The early stages of British biting midges *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) and allied Genera. *Bull Entomol Res.* 2009;43:421–67.
- Meiswinkel R, De Bree F, Bossers-De Vries R, Elbers AR. An unrecognized species of the *Culicoides obsoletus* complex feeding on livestock in The Netherlands. *Vet Parasitol.* 2015;207:324–8.
- Elbers AR, Meiswinkel R. *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) host preferences and biting rates in the Netherlands: comparing cattle, sheep and the black-light suction trap. *Vet Parasitol.* 2014;205:330–7.
- Harbach RE. Review of the internal classification of the genus *Anopheles* (Diptera, Culicidae) – the foundation for comparative systematics and phylogenetic research. *Bull Entomol Res.* 1994;84:331–42.
- Debeila TJ. Characterisation of selected *Culicoides* population in South Africa using genetic markers. PhD Thesis, Faculty of Veterinary Science, University of Pretoria; 2010.
- Tabachnick W. *Culicoides* and the global epidemiology of bluetongue virus infection. *Vet Ital.* 2004;40:144–50.
- Bakhoum MT, Labuschagne K, Huber K, Fall M, Mathieu B, Venter G, et al. Phylogenetic relationships and molecular delimitation of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) species in the Afrotropical region: interest for the subgenus *Avaritia*. *Syst Entomol.* 2018;43:355–71.
- Cetre-Sossah C, Baldet T, Delecolle JC, Mathieu B, Perrin A, Grillet C, et al. Molecular detection of *Culicoides* spp. and *Culicoides imicola*, the principal vector of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe. *Vet Res.* 2004;35:325–37.
- Gomulski LM, Meiswinkel R, Delecolle JC, Goffredo M, Gasperi G. Phylogeny of the subgenus *Culicoides* and related species in Italy, inferred from internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Med Vet Entomol.* 2006;20:229–38.
- Nolan DV, Carpenter S, Barber J, Mellor PS, Dallas JF, Mordue Luntz AJ, et al. Rapid diagnostic PCR assays for members of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* species complexes, implicated vectors of bluetongue virus in Europe. *Vet Microbiol.* 2007;124:82–94.
- Augot D, Sauvage F, Jouet D, Simphal E, Veuille M, Couloux A, et al. Discrimination of *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus*, potential bluetongue vectors, by morphometrical and mitochondrial cytochrome oxidase subunit I analysis. *Infect Genet Evol.* 2010;10:629–37.
- Pages N, Munoz-Munoz F, Talavera S, Sarto V, Lorca C, Nunez JI. Identification of cryptic species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in the subgenus *Culicoides* and development of species-specific PCR assays based on barcode regions. *Vet Parasitol.* 2009;165:298–310.
- Schwenkenbecher JM, Mordue AJ, Piertney SB. Phylogenetic analysis indicates that *Culicoides dewulfi* should not be considered part of the *Culicoides obsoletus* complex. *Bull Entomol Res.* 2009;99:371–5.
- Sarto i Monteyns V, Ventura D, Pages N, Aranda C, Escosa R. Expansion of *Culicoides imicola*, the main bluetongue virus vector in Europe, into Catalonia, Spain. *Vet Rec.* 2005;156:415–7.
- Harrup LE, Bellis GA, Balenghien T, Garros C. *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) taxonomy: current challenges and future directions. *Infect Genet Evol.* 2015;30:249–66.
- Delecolle JC. Nouvelle contribution à l'étude systématique et iconographique des espèces du genre *Culicoides* (Diptera: Cératopogonidae) du Nord-Est de la France. PhD Thesis, University of Strasbourg, Strasbourg; 1985.
- Campbell JA, Pelham-Clinton EC. Taxonomic review of the British species of *Culicoides* Latreille (Diptera, Ceratopogonidae). *Proc R Entomol Soc.* 1960;67:181–302.
- Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:1792–7.
- Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 2009;25:1451–2.
- Castresana J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol.* 2000;17:540–52.
- Wickham H. ggplot2: Elegant graphics for data analysis. *J R Stat Soc A Stat.* 2009;174:245–50.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 1980;16:111–20.
- Nei M, Rooney AP. Concerted and birth-and-death evolution of multi-gene families. *Annu Rev Genet.* 2005;39:121–52.

43. Kumar S, Stecher G, Li M, Niyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.* 2018;35:1547–9.
44. Reid NM, Garstens BC. Phylogenetic estimation error can decrease the accuracy of species delimitation: a Bayesian implementation of the general mixed Yule-coalescent model. *BMC Evol Biol.* 2012;12:196.
45. Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol.* 2012;29:1969–73.
46. Fujisawa T, Barraclough TG. Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets. *Syst Biol.* 2013;62:707–24.
47. Zhang J, Kapli P, Pavlidis P, Stamatakis A. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics.* 2013;29:2869–76.
48. Crozier RH, Crozier YC. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics.* 1993;133:97–117.
49. Möhlmann TWR, Bekendam AM, van Kemenade I, Wennergren U, Favia G, Takken W, et al. Latitudinal diversity of biting midge species within the *Obsoletus* group across three habitats in Europe. *Med Vet Entomol.* 2019;33:420–6.
50. Goffredo M, Meiswinkel R, Federici V, Di Nicola F, Mancini G, Ippoliti C, et al. The '*Culicoides obsoletus* group' in Italy: relative abundance, geographic range, and role as vector for bluetongue virus. *Vet Ital.* 2016;52:235–41.
51. Ippoliti C, Goffredo M, Salini R, Bocci M, Quaglia M, Federici V, et al. Ecological indicators for three *Culicoides* species of the *Obsoletus* complex in Italy. *Vet Ital.* 2016;52:213–22.
52. Ander M, Meiswinkel R, Chirico J. Seasonal dynamics of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae: *Culicoides*), the potential vectors of bluetongue virus, in Sweden. *Vet Parasitol.* 2012;184:59–67.
53. Allen AP, Gillooly JF. Assessing latitudinal gradients in speciation rates and biodiversity at the global scale. *Ecol Lett.* 2006;9:947–54.
54. Wenk CE, Kaufmann C, Schaffner F, Mathis A. Molecular characterization of Swiss Ceratopogonidae (Diptera) and evaluation of real-time PCR assays for the identification of *Culicoides* biting midges. *Vet Parasitol.* 2012;184:258–66.
55. Augot D, Mathieu B, Hadj-Henni L, Barriel V, Zapata Mena S, Smolis S, et al. Molecular phylogeny of 42 species of *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) from three continents. *Parasite.* 2017;24:23.
56. Kirkeby C, Dominiak P. *Culicoides (Avaritia) gornostaevae* Mirzaeva, 1984 (Diptera: Ceratopogonidae)—a possible vector species of the *Obsoletus* group new to the European fauna. *Parasit Vectors.* 2014;7:445.
57. Mathieu B, Delecalle JC, Garros C, Balenghien T, Setier-Rio ML, Candolfi E, et al. Simultaneous quantification of the relative abundance of species complex members: application to *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus* (Diptera: Ceratopogonidae), potential vectors of bluetongue virus. *Vet Parasitol.* 2011;182:297–306.
58. Pages N, Sarto IVM. Differentiation of *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus* (Diptera: Ceratopogonidae) based on mitochondrial cytochrome oxidase subunit I. *J Med Entomol.* 2005;42:1026–34.
59. Kiehl E, Walldorf V, Klimpel S, Al-Quraishy S, Mehlhorn H. The European vectors of bluetongue virus: are there species complexes, single species or races in *Culicoides obsoletus* and *C. pulicaris* detectable by sequencing ITS-1, ITS-2 and 18S-rDNA? *Parasitol Res.* 2009;105:331–6.
60. Esselstyn JA, Evans BJ, Sedlock JL, Anwarali Khan FA, Heaney LR. Single-locus species delimitation: a test of the mixed Yule-coalescent model, with an empirical application to Philippine round-leaf bats. *Proc R Entomol Soc.* 2012;279:3678–86.
61. Talavera G, Dinca V, Vila R. Factors affecting species delimitations with the GMYC model: insights from a butterfly survey. *Methods Ecol Evol.* 2013;4:1101–10.
62. Dellicour S, Flot JF. Delimiting species-poor data sets using single molecular markers: a study of barcode gaps, haplowebs and GMYC. *Syst Biol.* 2015;64:900–8.
63. Rosenberg NA. The probability of topological concordance of gene trees and species trees. *Theor Popul Biol.* 2002;61:225–47.
64. Nichols R. Gene trees and species trees are not the same. *Trends Ecol Evol.* 2001;16:358–64.
65. Pentinsaari M, Vos R, Mutanen M. Algorithmic single-locus species delimitation: effects of sampling effort, variation and nonmonophyly in four methods and 1870 species of beetles. *Mol Ecol Resour.* 2017;17:393–404.
66. Fujita MK, Leache AD, Burbrink FT, McGuire JA, Moritz C. Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends Ecol Evol.* 2012;27:480–8.
67. Leache AD, Fujita MK. Bayesian species delimitation in West African forest geckos (*Hemidactylus fasciatus*). *Proc R Entomol Soc.* 2010;277:3071–7.
68. Boykin LM, Schutze MK, Krosch MN, Chomič A, Chapman TA, Englezou A, et al. Multi-gene phylogenetic analysis of south-east Asian pest members of the *Bactrocera dorsalis* species complex (Diptera: Tephritidae) does not support current taxonomy. *J Appl Entomol.* 2014;138:235–53.
69. Dinca V, Lukhtanov VA, Talavera G, Vila R. Unexpected layers of cryptic diversity in wood white *Leptidea butterflies*. *Nat Commun.* 2011;2:324.
70. Hsieh CH, Ko CC, Chung CH, Wang HY. Multilocus approach to clarify species status and the divergence history of the *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) species complex. *Mol Phylogenet Evol.* 2014;76:172–80.
71. Song J-H, Ahn K-J. Species delimitation in the *Aleochara fucicola* species complex (Coleoptera: Staphylinidae: Aleocharinae) and its phylogenetic relationships. *Zool Scr.* 2014;43:629–40.

#### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

#### Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)



# Annexe 1 « Caractérisation de la variabilité génétique d'*Histomonas meleagridis* en relation avec son caractère pathogène »

---

*Histomonas meleagridis* est un protozoaire flagellé responsable de l'histomonose, une maladie affectant les galliformes. Cette maladie est caractérisée par une typhlo-hépatite, accompagnée d'une diarrhée jaune soufre, et peut être responsable d'un taux de mortalité élevé en particulier chez les dindes. L'importance économique de cette maladie est difficile à évaluer, mais la perte annuelle liée à la mortalité chez les dindes a été estimée aux Etats-Unis à plus de deux millions de dollars. Suite à l'application des nouveaux textes réglementaires européens, le retrait progressif du marché de la plupart des molécules actives contre *Histomonas* (comme le Diméridazol ou le Nifursol) a conduit à une augmentation importante de la prévalence de l'histomonose dans les pays européens. En France, entre mai et décembre 2003, plus de 50 lots atteints ont été déclarés, avec une mortalité pouvant atteindre 80% dans certains lots. Pendant cette période plus de 75000 dindes sont mortes (CIDEF, Comité Interprofessionnel de la Dinde Française).

Cette maladie présente des profils épidémiologiques extrêmement variés, aussi bien dans son spectre d'hôtes que dans son expression clinique. Elle touche en effet plusieurs espèces de galliformes comme la dinde, la perdrix, le poulet, la pintade, la caille, le paon, le faisan. Son expression clinique varie fortement, en allant de cas quasi asymptomatiques à des cas présentant des mortalités proches de 100% avec de fortes variations dans l'âge d'apparition, la morbidité, ou la mortalité. Cette variabilité peut être liée à plusieurs facteurs : (1) des facteurs environnementaux (type d'élevage, hygiène...), (2) des facteurs propres à l'hôte (race, variété, immunité...) et (3) des facteurs liés au parasite lui-même.

Le projet de recherche proposé lors de mon recrutement comportait deux volets l'étude de son cycle et de sa biologie, qui a été traité en priorité dès mon recrutement et l'épidémiologie génétique du parasite pour laquelle j'ai pu débiter la mise en place des outils nécessaires.

## 1. Etude de la biologie et du cycle parasitaire d'*Histomonas*

### 1.1 Cinétique d'infection d'*H. meleagridis* chez la dinde

Le cycle parasitaire d'*Histomonas* ainsi que sa biologie sont encore imparfaitement connus, notamment le cycle de circulation du parasite au sein de son hôte vertébré ainsi que sa circulation au sein des élevages. Une meilleure compréhension du cycle, couplée à des observations anatomo-pathologiques, permet de mieux cerner la pathogénie de la maladie.

Dans un premier, une PCR a été développée sur le gène de l'ARNr 18S qui permet la détection du génome d'*H. meleagridis* et qui permet de le différencier du génome de *Tetratrichomonas gallinarum*, un autre protozoaire parasite commun des volailles. Sa sensibilité a été évaluée et la fiabilité de cette PCR pour la détection des infections à *Histomonas* a été évaluée par infection expérimentale de dindes. Les résultats de la PCR semblent être en accord avec le développement des signes cliniques et des lésions cæcales. La PCR développée dans cette étude constitue un outil utile pour la détection et l'identification de *H. meleagridis* pour un dépistage rapide et de routine en complément de l'identification directe ou de la culture du parasite.

Afin de mieux appréhender le déroulement de la phase du cycle parasitaire chez la dinde, nous avons étudié la dissémination du parasite dans les jours qui suivent une infection. Un lot de dinde a été infecté per cloaca et tous les trois jours, de J0 à J19 post infection, un lot de quatre dindes a été sacrifié et autopsié. Une appréciation « scorée » (de 0 à 4) des lésions hépatiques et caecales a été réalisée, et pour chacune de ces dindes 15 prélèvements de tissus ont été réalisés (Figure 34). Ces prélèvements ont été analysés par PCR et soumis à un examen histopathologique, réalisé en collaboration l'unité d'Histologie, Anatomopathologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon. Un score histopathologique a été défini pour chacun de ces prélèvements (de 0 à 7 pour le caecum et de 0 à 4 pour les autres prélèvements). Dans le caecum le parasite a été détecté de J0 à J19 aussi bien par PCR que par observation microscopique. Les premières lésions macroscopiques sont apparues à J5 et leur intensité a augmenté jusqu'à J12. A partir de J12 une guérison progressive est observée. La plupart du temps les lésions histopathologiques étaient caractérisées par une infiltration de la lamina propria et de la sous-muqueuse par des cellules mononuclées. Cette infiltration dans les cas les plus sérieux peut atteindre la séreuse et les lymphocytes envahir le mésentère. Dans le foie, les parasites ont été détectés de J7 à J12. L'ADN parasitaire n'a pu être détecté par PCR que dans certaines lésions les plus sévères. Ceci est probablement dû à une distribution irrégulière du parasite au sein de cet organe. Les premières lésions macroscopiques sont apparues à J7. Le score hépatique moyen est maximal à J9 et diminue de J12 à J14. Les lésions microscopiques observées consistent en des zones de nécrose entourées de cellules mononuclées mixées à des hépatocytes. Pour ces deux organes une évolution similaire des scores macroscopiques et microscopiques a été observée mais avec une diminution plus lente des scores histopathologiques à la fin de l'expérience. De l'ADN parasitaire a été détecté de façon sporadique dans les autres organes mais le parasite n'a jamais été observé par microscopie. Les analyses histologiques ont seulement montré des lésions inflammatoires non spécifiques. Ces résultats nous ont permis de discuter deux principales hypothèses sur les voies de dissémination du parasite au sein de l'organisme : par voie sanguine ou par un transfert direct du parasite le long du péritonéum.



Figure 34 Exemple de lésions caecales et hépatiques de score 3 chez une dinde infectée par *H. meleagridis*

*Ce travail a fait l'objet de deux publications : n°13-14.*

## 1.2. Implication du petit ténébrion *Alphitobius diaperinus* dans la transmission de l'histomonose

*Alphitobius diaperinus*, ou petit ténébrion, est un coléoptère qui prolifère dans les bâtiments d'élevage. Il se nourrit volontiers d'aliments pour volailles, de fientes mais aussi d'animaux moribonds ou morts. En raison de ces habitudes alimentaires ce coléoptère peut se contaminer avec de nombreux pathogènes et il a déjà été montré qu'il pouvait transporter des virus, des bactéries, des champignons mais aussi des parasites y compris protozoaires.

Afin de vérifier si ce coléoptère pouvait jouer un rôle dans la transmission d'*H. meleagridis*, le parasite a été recherché par PCR dans des ténébrions collectés sur le terrain. Deux larves seulement ont été retrouvées positives qui provenaient de deux élevages subissant des épisodes d'histomonose. Afin de vérifier la capacité du coléoptère à s'infecter, l'infection expérimentale du ténébrion par le parasite a été réalisée. Les insectes, larves et adultes, ont ensuite été infectés au moyen d'un coton imbibé de culture parasitaire. L'ADN parasitaire n'a jamais été détecté chez les stades adultes, par contre à la fin de la période d'infection 5/20 larves ont été retrouvées positives et après 4 jours 2/20 larves restaient positives. Une autre expérience d'infection expérimentale a été menée dans le but de vérifier la viabilité d'*H. meleagridis* chez la larve. Des parasites vivants ont été détectés dans 5 larves sur 20, quatre jours après infection. Ces résultats permettent de penser que le petit ténébrion ne jouerait qu'un rôle limité dans la transmission d'*H. meleagridis* mais pourrait être accidentellement porteur de celui-ci.

*Linda Gouilloud et Arnaud Aymonin-Glorieux ont participé à cette étude dans le cadre de leurs stages de maîtrise. Ce travail a fait l'objet d'une publication : n°15*

## 2. Caractérisation de la variabilité génétique d'*Histomonas meleagridis* en relation avec son caractère pathogène.

A ce jour peu d'éléments sont connus sur la variabilité génétique d'*H. meleagridis*. Afin d'étudier cette variabilité, deux types d'outils ont été choisis : des marqueurs moléculaires d'évolution rapide, les microsatellites, et des marqueurs d'évolution plus lente les isoenzymes.

De par leurs propriétés, les microsatellites sont particulièrement adaptés à l'étude des populations d'espèces caractérisées par un faible polymorphisme. La recherche des microsatellites se fait par construction d'une banque d'ADN enrichie en motifs microsatellites. Une première banque enrichie avait été réalisée et avait permis d'isoler 25 microsatellites différents. Cependant, la plupart étaient d'origine bactérienne, la culture de parasite d'origine n'étant pas axénique. Pour pallier à cet inconvénient, une autre banque enrichie a été construite avec adjonction d'étapes supplémentaires de lavage du parasite avant extraction de son ADN. Vingt et un microsatellites dont la grande majorité ne sont a priori pas d'origine bactérienne ont été séquencés. Malheureusement, ils sont tous situés trop près du site de clonage pour pouvoir caractériser des amorces PCR. Une approche de type « Genome Walking » a été tentée essayer de déterminer les séquences flanquant le microsatellite. Elle a permis de séquencer les zones flanquant un microsatellite et de déterminer des amorces permettant son amplification. Le polymorphisme de ce microsatellite a été testé sur de l'ADN de 3 souches en culture et de 15 échantillons de fiente caecales porteuses d'*Histomonas* collectées dans des élevages atteints (dindes, pintades et paons). Ce microsatellite présente peu de polymorphisme car seuls deux allèles ont pu être caractérisés.

Le polymorphisme enzymatique est exploré par électrophorèse d'extraits protéiques. La technique choisie est celle de l'isoélectrofocalisation. Des essais préliminaires ont été réalisés au Centre National de Référence des Leishmania à Montpellier, puis la technique a été transférée au laboratoire. Onze systèmes enzymatiques différents ont été évalués, cinq ont donné des électromorphes distincts, deux n'ont pas pu être révélés et quatre nécessitent encore des améliorations des conditions opératoires. L'ensemble des souches conservées au laboratoire est en cours de typage.

Parallèlement, nous avons débuté la récolte de souches et d'informations phénotypiques sur les infections naturelles en élevage. Ce travail a été réalisé en collaboration avec des vétérinaires du terrain qui nous ont signalé les épisodes d'histomonose en élevage. Après autopsie des animaux, le contenu caecal a été mis en culture afin d'isoler le parasite. Les souches ainsi obtenues sont conservées en azote liquide. Le laboratoire dispose à ce jour de 17 souches cryoconservées.

*Christian Farge, étudiant en BTS et Annabelle Mendes, étudiante en DUT ont participé à ces travaux.*

*L'UMR 958 « Protozoaires Entériques des Volailles » ayant été placée en évolution au 1<sup>er</sup> janvier 2007 et le département Santé Animale d'INRAE ayant demandé ma mise à disposition, à compter du 1<sup>er</sup> octobre 2007, auprès de l'UPR 15 « Contrôle des maladies animales exotiques et émergentes » du CIRAD, mes activités de recherche sur l'histomonose de la dinde ont donc été interrompues à ce stade.*



## Références citées

---

- Abellán, P., and J.-C. Svenning. 2014. Refugia within refugia – patterns in endemism and genetic divergence are linked to Late Quaternary climate stability in the Iberian Peninsula. *Biological Journal of the Linnean Society* **113**:13-28.
- Adakal, H., L. Gavotte, F. Stachurski, M. Konkobo, H. Henri, S. Zoungrana, K. Huber, N. Vachieri, D. Martinez, S. Morand, and R. Frutos. 2010. Clonal origin of emerging populations of *Ehrlichia ruminantium* in Burkina Faso. *Infect Genet Evol* **10**:903-912.
- Adakal, H., D. F. Meyer, C. Carasco-Lacombe, V. Pinarello, F. Allegre, K. Huber, F. Stachurski, S. Morand, D. Martinez, T. Lefrancois, N. Vachieri, and R. Frutos. 2009. MLST scheme of *Ehrlichia ruminantium*: Genomic stasis and recombination in strains from Burkina-Faso. *Infection Genetics and Evolution* **9**:1320-1328.
- Adakal, H., F. Stachurski, and C. Chevillon. 2013. Tick control practices in Burkina Faso and acaricide resistance survey in *Rhipicephalus (Boophilus) geigy* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology* **59**:483-491.
- Ajmone-Marsan, P., J. F. Garcia, J. A. Lenstra, and C. Globaldiv. 2010. On the Origin of Cattle: How Aurochs Became Cattle and Colonized the World. *Evolutionary Anthropology* **19**:148-157.
- Alba, A., P. Casal DVM, DiplECVPH,, J., and M. Domingo. 2004. Possible introduction of bluetongue into the Balearic Islands, Spain, in 2000, via air streams. *Veterinary Record* **155**:460-461.
- Allsopp, M. T., and B. A. Allsopp. 2007. Extensive genetic recombination occurs in the field between different genotypes of *Ehrlichia ruminantium*. *Vet Microbiol* **124**:58-65.
- Ander, M., K. Troell, and J. Chirico. 2013. Barcoding of biting midges in the genus *Culicoides*: a tool for species determination. *Med Vet Entomol* **27**:323-331.
- Anderson, G. S., P. Belton, and N. Kleider. 1991. *Culicoides obsoletus* (Diptera: Ceratopogonidae) as a Causal Agent of *Culicoides* Hypersensitivity (Sweet Itch) in British Columbia. *Journal of medical entomology* **28**:685-693.
- Andrews, K. R., J. M. Good, M. R. Miller, G. Luikart, and P. A. Hohenlohe. 2016. Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics* **17**:81-92.
- Apanaskevich, D. A., and I. G. Horak. 2006. The genus *Hyalomma* Koch, 1844. I. Reinstatement of *Hyalomma (Euhyalomma) glabrum* Delpy, 1949 (Acari, Ixodidae) as a valid species with a redescription of the adults, the first description of its immature stages and notes on its biology. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research; Vol 73, No 1 (2006)DO - 10.4102/ojvr.v73i1.164*.
- Apanaskevich, D. A., and I. G. Horak. 2008. The genus *Hyalomma* Koch, 1844: v. re-evaluation of the taxonomic rank of taxa comprising the *H. (Euhyalomma) marginatum* koch complex of species (Acari: Ixodidae) with redescription of all parasitic stages and notes on biology. *International Journal of Acarology* **34**:13-42.
- Araya-Anchetta, A., J. D. Busch, G. A. Scoles, and D. M. Wagner. 2015. Thirty years of tick population genetics: A comprehensive review. *Infection, Genetics and Evolution* **29**:164-179.
- Augot, D., B. Mathieu, L. Hadj-Henni, V. Barriel, S. Zapata Mena, S. Smolis, D. Slama, F. J. Randrianambinintsoa, G. Trueba, M. Kaltenbach, N. Rahola, and J. Depaquit. 2017. Molecular phylogeny of 42 species of *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) from three continents. *Parasite* **24**:23.
- Augot, D., F. J. Randrianambinintsoa, A. Gasser, and J. Depaquit. 2013. Mention de deux espèces de *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) nouvelles à Madagascar et étude moléculaire montrant les paraphylies du sous-genre *Oecacta* et du groupe *Schultzei*. *Bulletin de la Société de pathologie exotique* **106**:201-205.
- Bah, M. T., V. Grobois, F. Stachurski, F. Munoz, M. Duhayon, I. Rakotoarivony, A. Appelgren, C. Calloix, L. N. Zayas, T. Mouillaud, C. Andary, R. Lancelot, K. Huber, C. Garros, A. Leblond, and L. Vial. 2021. The Crimean-Congo haemorrhagic fever tick vector *Hyalomma marginatum* in south of France: Modelling its distribution and determination of factors influencing its establishment in a newly invaded area.
- Baird, N. A., P. D. Etter, T. S. Atwood, M. C. Currey, A. L. Shiver, Z. A. Lewis, E. U. Selker, W. A. Cresko, and E. A. Johnson. 2008. Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. *PLoS One* **3**:e3376.
- Barbara, T., C. Palma-Silva, G. M. Paggi, F. Bered, M. F. Fay, and C. Lexer. 2007. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Mol Ecol* **16**:3759-3767.
- Barré, N. 1989. Biologie et écologie de la tique *Amblyomma Variegatum* (Acarina : Ixodina) en Guadeloupe (Antilles françaises).

- Barre, N., and G. I. Garris. 1990. Biology and ecology of *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) in the Caribbean: Implications for a regional eradication program. *Journal of Agricultural Entomology* **7**:1-9.
- Barre, N., and P. C. Morel. 1983. Ticks (Acarina, Ixodoidea) of the Mascarene Islands (Indian Ocean) and diseases transmitted by them. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* **36**:371-377.
- Bartley, D., M. Bagley, G. Gall, and B. Bentley. 1992. Use of linkage disequilibrium data to estimate effective size of hatchery and natural fish populations. *Conservation Biology* **6**:365-375.
- Beati, L., J. Patel, H. Lucas-Williams, H. Adakal, E. G. Kanduma, E. Tembo-Mwase, R. Krecek, J. W. Mertins, J. T. Alfred, S. Kelly, and P. Kelly. 2012. Phylogeography and Demographic History of *Amblyomma variegatum* (Fabricius) (Acari: Ixodidae), the Tropical Bont Tick. *Vector Borne Zoonotic Dis* **12**:514-525.
- Beaumont, M. A., W. Zhang, and D. J. Balding. 2002. Approximate Bayesian computation in population genetics. *Genetics* **162**:2025-2035.
- Bellis, G., A. Dyce, D. Gopurenko, T. Yanase, C. Garros, K. Labuschagne, and A. Mitchell. 2014. Revision of the *Culicoides* (Avaritia) *Imicola* complex Khamala & Kettle (Diptera: Ceratopogonidae) from the Australasian region. *Zootaxa* **3768**:401-427.
- Blench, R., and K. MacDonald. 2006. The origins and development of African livestock: archaeology, genetics, linguistics and ethnography. Routledge.
- Boivin, N., A. Crowther, R. Helm, and D. Fuller. 2013. East Africa and Madagascar in the Indian Ocean world. *Journal of World Prehistory* **26**:213-281.
- Borkent, A. 2016. World Species of Biting Midges (Diptera: Ceratopogonidae).
- Bournez, L., N. Cangi, R. Lancelot, D. R. J. Pleydell, F. Stachurski, J. Bouyer, D. Martinez, T. Lefrancois, L. Neves, and J. Pradel. 2015. Parapatric distribution and sexual competition between two tick species, *Amblyomma variegatum* and *A. hebraeum* (Acari, Ixodidae), in Mozambique. *Parasites & Vectors* **8**.
- Bourquia, M., C. Garros, I. Rakotoarivony, I. Boukhari, M. Chakrani, K. Huber, L. Gardès, W. Wint, T. Baldet, and K. Khallaayoune. 2020. Composition and seasonality of *Culicoides* in three host environments in Rabat region (Morocco). *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux* **73**:37-46.
- Bourquia, M., C. Garros, I. Rakotoarivony, L. Gardes, K. Huber, I. Boukhari, J. C. Delecolle, T. Baldet, A. Mignotte, Y. Lhor, K. Khallaayoune, and T. Balenghien. 2019. Update of the species checklist of *Culicoides* Latreille, 1809 biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) of Morocco. *Parasites & Vectors* **12**.
- Bowden, J. J., and C. M. Buddle. 2010. Determinants of ground-dwelling spider assemblages at a regional scale in the Yukon Territory, Canada. *Écoscience* **17**:287-297.
- Braverman, Y., and F. Chechik. 1996. Air streams and the introduction of animal diseases borne on *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) into Israel. *Rev Sci Tech* **15**:1037-1052.
- Burgin, L. E., J. Gloster, C. Sanders, P. S. Mellor, S. Gubbins, and S. Carpenter. 2013. Investigating incursions of bluetongue virus using a model of long-distance *Culicoides* biting midge dispersal. *Transbound Emerg Dis* **60**:263-272.
- Bush, A. O., K. D. Lafferty, J. M. Lotz, and A. W. Shostak. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al revisited. *Journal of Parasitology* **83**:575-583.
- Calvo, J. H., C. Calvete, A. Martinez-Royo, R. Estrada, M. A. Miranda, D. Borrás, I. M. V. Sarto, N. Pages, J. A. Delgado, F. Collantes, and J. Lucientes. 2009. Variations in the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene indicate northward expanding populations of *Culicoides imicola* in Spain. *Bull Entomol Res* **99**:583-591.
- Camus, E., and N. Barre. 1995. Vector situation of tick-borne diseases in the Caribbean islands. *Vet Parasitol* **57**:167-176.
- Camus, E., J.-C. Fourrier, and M. Vely. 1998. Présence de la cowdriose (heartwater) à Mayotte (océan Indien). *Rev Elev Med Vet Pays Trop* **51**:282.
- Carpenter, S., H. L. Lunt, D. Arav, G. J. Venter, and P. S. Mellor. 2006. Oral Susceptibility to Bluetongue virus of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from the United Kingdom. *Journal of medical entomology* **43**:73-78.
- Cavalli-Sforza, L. L., and A. W. Edwards. 1967. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *American journal of human genetics* **19**:233-257.
- Cêtre-Sossah, C., M. Roger, C. Sailleau, L. Rieau, S. Zientara, E. Bréard, C. Viarouge, M. Beral, O. Esnault, and E. Cardinale. 2014. Epizootic haemorrhagic disease virus in Reunion Island: evidence for the circulation of a new serotype and associated risk factors. *Veterinary microbiology* **170**:383-390.
- Cha, C. H., and C. C. Sik. 1974. Notes on biting midges of the Genus *Culicoides* from South Korea - with special reference to unrecorded species and distribution. *Korean J Parasitol* **12**:45-75.
- Chapuis, M. P., and A. Estoup. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* **24**:621-631.

- Chevillon, C., M. de Garine-Wichatitsky, N. Barre, S. Ducornez, and T. de Meeus. 2013. Understanding the genetic, demographical and/or ecological processes at play in invasions: lessons from the southern cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology* **59**:203-218.
- Chevillon, C., S. Ducornez, T. de Meeus, B. B. Koffi, H. Gaia, J. M. Delathiere, and N. Barre. 2007. Accumulation of acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari : Ixodidae) populations from New Caledonia Island. *Vet Parasitol* **147**:276-288.
- Corn, J. L., N. Barré, B. Thiebot, T. E. Creekmore, G. I. Garris, and V. F. Nettles. 1993. Potential Role of Cattle Egrets, *Bubulcus ibis* (Ciconiformes: Ardeidae), in the Dissemination of *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) in the Eastern Caribbean. *J Med Entomol* **30**:1029-1037.
- Cornuet, J.-M., P. Pudlo, J. Veyssier, A. Dehne-Garcia, M. Gautier, R. Leblois, J.-M. Marin, and A. Estoup. 2014. DIYABC v2.0: a software to make approximate Bayesian computation inferences about population history using single nucleotide polymorphism, DNA sequence and microsatellite data. *Bioinformatics* **30**:1187-1189.
- Cote, J., G. Bocedi, L. Debeffe, M. E. Chudzińska, H. C. Weigang, C. Dytham, G. Gonzalez, E. Matthysen, J. Travis, M. Baguette, and A. J. M. Hewison. 2017. Behavioural synchronization of large-scale animal movements – disperse alone, but migrate together? *Biological Reviews* **92**:1275-1296.
- Criscione, C. D., and M. S. Blouin. 2005. Effective sizes of macroparasite populations: a conceptual model. *Trends Parasitol* **21**:212-217.
- Cruaud, A., V. Lehrter, G. Genson, J.-Y. Rasplus, and J. Depaquit. 2021. Evolution, systematics and historical biogeography of sand flies of the subgenus *Paraphlebotomus* (Diptera, Psychodidae, Phlebotomus) inferred using restriction-site associated DNA markers. *PLoS Negl Trop Dis* **15**:e0009479.
- Cuéllar, A. C., L. J. Kjær, C. Kirkeby, H. Skovgard, S. A. Nielsen, A. Stockmarr, G. Andersson, A. Lindstrom, J. Chirico, R. Lühken, S. Steinke, E. Kiel, J. Gethmann, F. J. Conraths, M. Larska, I. Hamnes, S. Sviland, P. Hopp, K. Brugger, F. Rubel, T. Balenghien, C. Garros, I. Rakotoarivony, X. Allène, J. Lhoir, D. Chavernac, J.-C. Delécolle, B. Mathieu, D. Delécolle, M.-L. Setier-Rio, R. Venail, B. Scheid, M. Á. M. Chueca, C. Barceló, J. Lucientes, R. Estrada, A. Mathis, W. Tack, and R. Bødker. 2018. Spatial and temporal variation in the abundance of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in nine European countries. *Parasites & Vectors* **11**:112.
- Cumming, G. S. 1999. Host distributions do not limit the species ranges of most African ticks (Acari : Ixodida). *Bulletin of Entomological Research* **89**:303-327.
- Dallas, J. F., R. H. Cruickshank, Y. M. Linton, D. V. Nolan, M. Patakakis, Y. Braverman, R. Capela, M. Capela, I. Pena, R. Meiswinkel, M. D. Ortega, M. Baylis, P. S. Mellor, and A. J. Mordue Luntz. 2003. Phylogenetic status and matrilineal structure of the biting midge, *Culicoides imicola*, in Portugal, Rhodes and Israel. *Med Vet Entomol* **17**:379-387.
- de la Fuente, J. 2003. The fossil record and the origin of ticks (Acari: Parasitiformes: Ixodida). *Exp Appl Acarol* **29**:331-344.
- de la Harpe, M., M. Paris, D. N. Karger, J. Rolland, M. Kessler, N. Salamin, and C. Lexer. 2017. Molecular ecology studies of species radiations: current research gaps, opportunities and challenges. *Mol Ecol* **26**:2608-2622.
- de Meeus, T., P. F. Humair, C. Grunau, C. Delaye, and F. Renaud. 2004. Non-Mendelian transmission of alleles at microsatellite loci: an example in *Ixodes ricinus*, the vector of Lyme disease. *Int J Parasitol* **34**:943-950.
- De Queiroz, K. 2007. Species Concepts and Species Delimitation. *Systematic Biology* **56**:879-886.
- DeChaine, E. G. 2008. A bridge or a barrier? Beringia's influence on the distribution and diversity of tundra plants. *Plant Ecology & Diversity* **1**:197-207.
- Delatte, H., L. Bagny, C. Brengue, A. Bouetard, C. Paupy, and D. Fontenille. 2011. The invaders: Phylogeography of dengue and chikungunya viruses *Aedes* vectors, on the South West islands of the Indian Ocean. *Infection Genetics and Evolution* **11**:1769-1781.
- Desvars, A., Y. Grimaud, H. Guis, O. Esnault, X. Allène, L. Gardès, T. Balenghien, T. Baldet, J. C. Delécolle, and C. Garros. 2015. First overview of the *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) livestock associated species of Reunion Island, Indian Ocean. *Acta tropica* **142**:5-19.
- Diagne, C., B. Leroy, A.-C. Vaissière, R. E. Gozlan, D. Roiz, I. Jarić, J.-M. Salles, C. J. A. Bradshaw, and F. Courchamp. 2021. High and rising economic costs of biological invasions worldwide. *Nature* **592**:571-576.
- Dickson, L. B., C. L. Campbell, P. Juneja, F. M. Jiggins, M. Sylla, and W. C. Black, IV. 2017. Exon-Enriched Libraries Reveal Large Genic Differences Between *Aedes aegypti* from Senegal, West Africa, and Populations Outside Africa. *G3 Genes|Genomes|Genetics* **7**:571-582.

- Dickson, L. B., M. V. Sharakhova, V. A. Timoshevskiy, K. L. Fleming, A. Caspary, M. Sylla, and W. C. I. V. Black. 2016. Reproductive Incompatibility Involving Senegalese *Aedes aegypti* (L) Is Associated with Chromosome Rearrangements. *Plos Neglected Tropical Diseases* **10**:e0004626.
- Dietrich, M., F. Kempf, T. Boulinier, and K. D. McCoy. 2014. Tracing the colonization and diversification of the worldwide seabird ectoparasite *Ixodes uriae*. *Mol Ecol* **23**:3292-3305.
- Diouf, B., I. Dia, N. M. Sene, E. H. Ndiaye, M. Diallo, and D. Diallo. 2020. Morphology and taxonomic status of *Aedes aegypti* populations across Senegal. *PLoS ONE* **15**:e0242576.
- Du Plessis, J. L., L. Van Gas, J. A. Olivier, and J. D. Bezuidenhout. 1989. The heterogeneity of Cowdria ruminantium stocks: cross-immunity and serology in sheep and pathogenicity to mice. *Onderstepoort J Vet Res* **56**:195-201.
- Dujardin, J. P. 1998. Population genetics and the natural history of domestication in Triatominae. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **93**:34-36.
- Elbers, A. R. W., R. Meiswinkel, E. van Weezep, M. M. S. van Oldruitenborgh-Oosterbaan, and E. A. Kooi. 2013. Schmallenberg Virus in Culicoides spp. Biting Midges, the Netherlands, 2011. *Emerging Infectious Diseases* **19**:106-109.
- Elias, M., R. I. Hill, K. R. Willmott, K. K. Dasmahapatra, A. V. Z. Brower, J. Mallet, and C. D. Jiggins. 2007. Limited performance of DNA barcoding in a diverse community of tropical butterflies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **274**:2881-2889.
- Elshire, R. J., J. C. Glaubitz, Q. Sun, J. A. Poland, K. Kawamoto, E. S. Buckler, and S. E. Mitchell. 2011. A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. *PLoS One* **6**:e19379.
- Estoup, A., and T. Guillemaud. 2010. Reconstructing routes of invasion using genetic data: why, how and so what? *Mol Ecol*.
- Estrada-Peña, A., A. Cabezas-Cruz, T. Pollet, M. Vayssier-Taussat, and J.-F. Cosson. 2018. High Throughput Sequencing and Network Analysis Disentangle the Microbial Communities of Ticks and Hosts Within and Between Ecosystems. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **8**.
- Estrada-Peña, A., G. D'Amico, and N. Fernández-Ruiz. 2021. Modelling the potential spread of *Hyalomma marginatum* ticks in Europe by migratory birds. *Int J Parasitol* **51**:1-11.
- Estrada-Peña, A., M. Martínez Aviles, and M. J. Muñoz Reoyo. 2011. A Population Model to Describe the Distribution and Seasonal Dynamics of the Tick *Hyalomma marginatum* in the Mediterranean Basin. *Transbound Emerg Dis* **58**:213-223.
- Estrada-Peña, A., A. Mihalca, and T. Petney. 2017. Ticks of Europe and North Africa: A Guide to Species Identification.
- Estrada-Peña, A., R. G. Pegram, N. Barre, and J. M. Venzal. 2007. Using invaded range data to model the climate suitability for *Amblyomma variegatum* (Acari : Ixodidae) in the New World. *Experimental and Applied Acarology* **41**:203-214.
- Estrada-Peña, A., N. Sánchez, and A. Estrada-Sánchez. 2012. An Assessment of the Distribution and Spread of the Tick *Hyalomma marginatum* in the Western Palearctic Under Different Climate Scenarios. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **12**:758-768.
- Estrada-peña, A., and J. M. Venzal. 2007. Climate Niches of Tick Species in the Mediterranean Region: Modeling of Occurrence Data, Distributional Constraints, and Impact of Climate Change. *J Med Entomol* **44**:1130-1138.
- Excoffier, L., P. E. Smouse, and J. M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**:479-491.
- Facon, B., B. J. Genton, J. Shykoff, P. Jarne, A. Estoup, and P. David. 2006. A general eco-evolutionary framework for understanding bioinvasions. *Trends in ecology & evolution* **21**:130-135.
- Failloux, A.-B., M. Vazeille, and F. Rodhain. 2002. Geographic genetic variation in populations of the dengue virus vector *Aedes aegypti*. *Journal of Molecular Evolution* **55**:653-663.
- Falco, R. C., and D. Fish. 1991. Horizontal movement of adult *Ixodes damini* (Acari, Ixodidae) attracted to CO<sub>2</sub>-baited traps. *Journal of Medical Entomology* **28**:726-729.
- Farougou, S., H. Adakal, and C. Boko. 2013. Evaluation de la prévalence de la cowdriose chez les ruminants domestiques au Bénin. *Rev Med Veterinaire* **164**:572-576.
- Farougou, S., M. Kpodekon, and A. Tassou. 2007. Abondance saisonnière des tiques (Acari: Ixodidae) parasites des bovins dans la zone soudanienne du Bénin: cas des départements du Borgou et de l'Alibori. *Rev Afric Santé Prod Anim* **5**:61-67.
- Fu, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* **147**:915-925.

- Fujita, M. K., A. D. Leaché, F. T. Burbrink, J. A. McGuire, and C. Moritz. 2012. Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends in Ecology & Evolution* **27**:480-488.
- Gao, H., L. Wang, J. Ma, X. Gao, J. Xiao, and H. Wang. 2021a. Modeling the current distribution suitability and future dynamics of *Culicoides imicola* under climate change scenarios. *PeerJ* **9**:e12308.
- Gao, X., L. Wang, T. Liu, J. Xiao, and H. Wang. 2021b. Effect of agro-ecological landscape on the distribution of *Culicoides obsoletus* in northeast China. *Pest Management Science* **77**:693-696.
- Garris, G. I., and N. Barre. 1991. Acaricide susceptibility of *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) from Puerto-Rico and Guadeloupe. *Exp Appl Acarol* **12**:171-179.
- Garros, C., and T. Balenghien. 2017. Les *Culicoides* (Diptera : Ceratopogonidae). Pages 345-365 in G. Duvallat, D. Fontenille, and V. Robert, editors. *Entomologie médicale et vétérinaire*. IRD Editions, Editions QUAE, Marseille, Versailles.
- Garros, C., K. Labuschagne, L. Dommergues, M. s. Ben, T. Balenghien, F. Muñoz, M. T. Bakhom, E. Cardinale, and H. Guis. 2019. *Culicoides* Latreille in the sun: faunistic inventory of *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) in Mayotte (Comoros Archipelago, Indian Ocean). *Parasites & Vectors* **12**:135.
- Gillard, A. 1949. Etude des tiques et de la baesielliose bovine à la Réunion. *Revue agricole de l'île de la Réunion* **49**.
- Gloster, J., L. Burgin, C. Witham, M. Athanassiadou, and Y. S. Mellor. 2008. Bluetongue in the United Kingdom and northern Europe in 2007 and key issues for 2008. *Veterinary Record* **162**:298-302.
- Gómez-Díaz, E., P. F. Doherty Jr, D. Duneau, and K. D. McCoy. 2010. Cryptic vector divergence masks vector-specific patterns of infection: an example from the marine cycle of Lyme borreliosis. *Evolutionary Applications* **3**:391-401.
- Gratton, P., E. Trucchi, A. Trasatti, G. Riccarducci, S. Marta, G. Allegrucci, D. Cesaroni, and V. Sbordoni. 2015. Testing Classical Species Properties with Contemporary Data: How “Bad Species” in the Brassy Ringlets (*Erebia tyndarus* complex, Lepidoptera) Turned Good. *Syst Biol* **65**:292-303.
- Grech-Angelini, S., F. Stachurski, R. Lancelot, J. Boissier, J.-F. Allienne, M. Gharbi, and G. Uilenberg. 2016. First report of the tick *Hyalomma scupense* (natural vector of bovine tropical theileriosis) on the French Mediterranean island of Corsica. *Vet Parasitol* **216**:33-37.
- Grechko, V. V. 2011. Repeated DNA sequences as an engine of biological diversification. *Molecular Biology* **45**:704-727.
- Grimaud, Y., H. Guis, F. Chiroleu, F. Boucher, A. Tran, I. Rakotoarivony, M. Duhayon, C. Cêtre-Sossah, O. Esnault, E. Cardinale, and C. Garros. 2019. Modelling temporal dynamics of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) populations on Reunion Island (Indian Ocean), vectors of viruses of veterinary importance. *Parasites & Vectors* **12**:562.
- Gubbins, S., J. Turner, M. Baylis, Y. van der Stede, G. van Schaik, J. C. Abrahantes, and A. J. Wilson. 2014. Inferences about the transmission of Schmallenberg virus within and between farms. *Preventive Veterinary Medicine* **116**:380-390.
- Hadj-Henni, L., T. De Meulemeester, B. Mathieu, J. Depaquit, and D. Augot. 2015. Taxonomic assessment of *Culicoides brunnicans*, *C. santonicus* and *C. vexans* (Diptera: Ceratopogonidae) in France: Implications in systematics. *Infection, Genetics and Evolution* **33**:324-331.
- Hakima, B., H.-S. Hwang, and K.-Y. Lee. 2020. Molecular identification of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) species in Algeria. *Acta tropica* **202**:105261.
- Hanotte, O., D. G. Bradley, J. W. Ochieng, Y. Verjee, E. W. Hill, and J. E. Rege. 2002. African pastoralism: genetic imprints of origins and migrations. *Science* **296**:336-339.
- Harrup, L. E., G. A. Bellis, T. Balenghien, and C. Garros. 2015. *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) taxonomy: Current challenges and future directions. *Infection Genetics and Evolution* **30**:249-266.
- Hartl, D. L., and A. G. Clark. 1997. *Principles of population genetics*. Sinauer Associates Inc, Sunderland Massachusetts.
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball, and J. R. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. Biological sciences* **270**:313-321.
- Hedrick, P. 2000. *Genetics of populations*. Jones and Bartlett Publishers Massachusetts.
- Hekimoglu, O., I. Baris, and N. Ozer. 2019. Development and characterization of five microsatellite loci for the hard tick *Hyalomma marginatum* (Acari: Ixodidae), through next generation sequencing. *Systematic and Applied Acarology* **24**:1988-1994, 1987.
- Hewitt, G. M. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **359**:183-195.
- Hoogstraal, H. 1979. Review Article1: The Epidemiology of Tick-Borne Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Asia, Europe, and Africa. *J Med Entomol* **15**:307-417.

- Huber, K., S. Jacquet, R. Rivallan, H. Adakal, N. Vachieri, A. M. Risterucci, and C. Chevillon. 2019. Low effective population sizes in *Amblyomma variegatum*, the tropical bont tick. *Ticks and Tick-Borne Diseases* **10**:93-99.
- Hughes, A. L., and J. O. French. 2007. Homologous recombination and the pattern of nucleotide substitution in *Ehrlichia ruminantium*. *Gene* **387**:31-37.
- Jacquet, S., K. Huber, H. Guis, M. L. Setier-Rio, M. Goffredo, X. Allene, I. Rakotoarivony, C. Chevillon, J. Bouyer, T. Baldet, T. Balenghien, and C. Garros. 2016a. Spatio-temporal genetic variation of the biting midge vector species *Culicoides imicola* (Ceratopogonidae) Kieffer in France. *Parasites & Vectors* **9**.
- Jacquet, S., K. Huber, N. Pages, S. Talavera, L. E. Burgin, S. Carpenter, C. Sanders, A. H. Dicko, M. Djerbal, M. Goffredo, Y. Lhor, J. Lucientes, M. A. Miranda-Chueca, I. P. Da Fonseca, D. W. Ramilo, M. L. Setier-Rio, J. Bouyer, C. Chevillon, T. Balenghien, H. Guis, and C. Garros. 2016b. Range expansion of the bluetongue vector, *Culicoides imicola*, in continental France likely due to rare wind-transport events. *Scientific Reports* **6**.
- Jacquot, M., K. Nomikou, M. Palmarini, P. Mertens, and R. Biek. 2017. Bluetongue virus spread in Europe is a consequence of climatic, landscape and vertebrate host factors as revealed by phylogeographic inference. *Proceedings. Biological sciences* **284**.
- Jarne, P., and P. J. L. Lagoda. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *TREE* **11**:424-429.
- Jay, F., P. Sjödin, M. Jakobsson, and M. G. B. Blum. 2012. Anisotropic Isolation by Distance: The Main Orientations of Human Genetic Differentiation. *Molecular Biology and Evolution* **30**:513-525.
- Jori, F., M. Roger, T. Baldet, J.-C. Delécolle, J. Sauzier, M. R. Jaumally, and F. Roger. 2011. Orbiviruses in Rusa deer, Mauritius, 2007. *Emerging Infectious Diseases* **17**:312-313.
- Kabore, H., M. S. Salembere, and H. H. Tamboura. 1998. Seasonal variation of ticks on cattle in Burkina Faso. Pages 398-401 in F. Jongejan, W. Goff, and E. Camus, editors. *Tropical Veterinary Medicine: Molecular Epidemiology, Hemoparasites and Their Vectors, and General Topics*. New York Acad Sciences, New York.
- Kampen, H., and D. Werner. 2011. Arthropod vectors and their growing importance in Europe. Pages 259-282 in H. Mehlhorn, editor. *Progress in Parasitology*. Springer, Berlin, Germany.
- Kempf, F., T. De Meeus, E. Vaumourin, V. Noel, V. Taragel'ova, O. Plantard, D. J. A. Heylen, C. Eraud, C. Chevillon, and K. D. McCoy. 2011. Host races in *Ixodes ricinus*, the European vector of Lyme borreliosis. *Infection Genetics and Evolution* **11**:2043-2048.
- Kilpatrick, A. M., and S. E. Randolph. 2012. Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. *The Lancet* **380**:1946-1955.
- Kirkeby, C., R. Bodker, A. Stockmarr, P. Lind, and P. M. H. Heegaard. 2013. Quantifying Dispersal of European *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) Vectors between Farms Using a Novel Mark-Release-Recapture Technique. *Plos One* **8**.
- Klimaszewski, J., R. P. Webster, C. Bourdon, G. Pelletier, B. Godin, and D. Langor. 2015. Review of Canadian species of the genus *Mocyta* Mulsant & Rey (Coleoptera, Staphylinidae, Aleocharinae), with the description of a new species and a new synonymy. *ZooKeys* **487**.
- Kluiters, G., H. Swales, and M. Baylis. 2015. Local dispersal of palaeartic *Culicoides* biting midges estimated by mark-release-recapture. *Parasites & Vectors* **8**.
- Koffi, B. B., T. de Meeus, N. Barre, P. Durand, C. Arnathau, and C. Chevillon. 2006a. Founder effects, inbreeding and effective sizes in the Southern cattle tick: the effect of transmission dynamics and implications for pest management. *Mol Ecol* **15**:4603-4611.
- Koffi, B. B., A. M. Risterucci, D. Joulia, P. Durand, N. Barre, T. De Meeus, and C. Chevillon. 2006b. Characterization of polymorphic microsatellite loci within a young *Boophilus microplus* metapopulation. *Molecular Ecology Notes* **6**:502-504.
- Landguth, E. L., S. A. Cushman, M. A. Murphy, and G. Luikart. 2010. Relationships between migration rates and landscape resistance assessed using individual-based simulations. *Mol Ecol Resour* **10**:854-862.
- Leger, E., G. Vourc'h, L. Vial, C. Chevillon, and K. D. McCoy. 2013. Changing distributions of ticks: causes and consequences. *Experimental and Applied Acarology* **59**:219-244.
- Lorenzen, E. D., R. Heller, and H. R. Siegismund. 2012. Comparative phylogeography of African savannah ungulates1. *Molecular Ecology* **21**:3656-3670.
- Lv, J., S. Wu, Y. Zhang, Y. Chen, C. Feng, X. Yuan, G. Jia, J. Deng, C. Wang, Q. Wang, L. Mei, and X. Lin. 2014. Assessment of four DNA fragments (COI, 16S rDNA, ITS2, 12S rDNA) for species identification of the Ixodida (Acari: Ixodida). *Parasites & Vectors* **7**:93.
- Maan, S., A. R. Samuel, N. S. Maan, H. Attoui, S. Rao, and P. P. Mertens. 2004. Molecular epidemiology of bluetongue viruses from disease outbreaks in the Mediterranean Basin. *Vet Ital* **40**:489-496.

- Macaigne, F., and C. Perez-Eid. 1993. *Hyalomma scupense* Schulze, 1919 (Acarina, Ixodoidea) tique autochtone du Sud-Ouest de la France. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **68**:199-200.
- Madder, M., E. Thys, L. Achi, A. Toure, and R. De Deken. 2011. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: a most successful invasive tick species in West-Africa. *Experimental and Applied Acarology* **53**:139-145.
- Magee, D. A., C. Meghen, S. Harrison, C. S. Troy, T. Cymbron, C. Gaillard, A. Morrow, J. C. Maillard, and D. G. Bradley. 2002. A Partial African Ancestry for the Creole Cattle Populations of the Caribbean. *Journal of Heredity* **93**:429-432.
- Maillard, J., and N. Maillard. 1998. Historique du peuplement bovin et de l'introduction de la tique *Amblyomma variegatum* dans les îles françaises des Antilles : synthèse bibliographique. *Ethnozootechnie varia* **4**:19-36.
- Manel, S., M. K. Schwartz, G. Luikart, and P. Taberlet. 2003. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology & Evolution* **18**:189-197.
- Mardulyn, P., M. Goffredo, A. Conte, G. Hendrickx, R. Meiswinkel, T. Balenghien, S. Sghaier, Y. Lohr, and M. Gilbert. 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.
- Martinez-de la Puente, J., J. Martinez, M. Ferraguti, A. Morales-de la Nuez, N. Castro, and J. Figuerola. 2012. Genetic characterization and molecular identification of the bloodmeal sources of the potential bluetongue vector *Culicoides obsoletus* in the Canary Islands, Spain. *Parasites & Vectors* **5**.
- 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.
- McCoy, K. D., E. Leger, and M. Dietrich. 2013. Host specialization in ticks and transmission of tick-borne diseases: a review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **3**.
- McNeely, J. A. 2006. As the world gets smaller, the chances of invasion grow. *Euphytica* **148**:5-15.
- Meiswinkel, R., F. De Bree, R. Bossers-De Vries, and A. R. W. Elbers. 2015. An unrecognized species of the *Culicoides obsoletus* complex feeding on livestock in the Netherlands. *Veterinary Parasitology* **207**:324-328.
- Meiswinkel, R., L. M. Gomulski, J. C. Delecolle, M. Goffredo, and G. Gasperi. 2004. The taxonomy of *Culicoides* vector complexes - unfinished business. Pages 151-159 in N. J. MacLachlan and J. E. Pearson, editors. *Bluetongue, Pt 1, Proceedings. Ist Zooprofilattico Sperimentale Dell Abruzzo E Del Molise G Caporale, Teramo.*
- Mellor, P. S., M. Baylis, and P. P. C. Mertens. 2009. *Bluetongue*. Elsevier, Academic press, Amsterdam.
- Mellor, P. S., and E. J. Wittmann. 2002. Bluetongue virus in the Mediterranean Basin 1998-2001. *Veterinary Journal* **164**:20-37.
- Mignotte, A., C. Garros, S. Dellicour, M. Jacquot, M. Gilbert, L. Gardès, T. Balenghien, M. Duhayon, I. Rakotoarivony, M. de Wavrechin, and K. Huber. 2021. High dispersal capacity of *Culicoides obsoletus* (Diptera: Ceratopogonidae), vector of bluetongue and Schmallenberg viruses, revealed by landscape genetic analyses. *Parasites & Vectors* **14**:93.
- Mignotte, A., C. Garros, L. Gardès, T. Balenghien, M. Duhayon, I. Rakotoarivony, L. Tabourin, L. Poujol, B. Mathieu, A. Ibañez-Justicia, A. Deniz, A. Cvetkovikj, B. V. Purse, D. W. Ramilo, D. Stougiou, D. Werner, D. Pudar, D. Petrić, E. Veronesi, F. Jacobs, H. Kampen, I. Pereira da Fonseca, J. Lucientes, J. Navarro, J. M. de la Puente, J. Stefanovska, K. R. Searle, K. Khallaayoune, C. L. Culverwell, M. Larska, M. Bourquia, M. Goffredo, M. Bisia, M. England, M. Robin, M. Quaglia, M. Á. Miranda-Chueca, R. Bødker, R. Estrada-Peña, S. Carpenter, S. Tchakarova, S. Boutsini, S. Sviland, S. M. Schäfer, Z. Ozoliņa, Z. Segliņa, Z. Vatansever, and K. Huber. 2020. The tree that hides the forest: cryptic diversity and phylogenetic relationships in the Palaearctic vector *Obsoletus/Scoticus* Complex (Diptera: Ceratopogonidae) at the European level. *Parasites & Vectors* **13**:265.
- Monaco, F., L. Benedetto, V. Di Marcello, R. Lelli, and M. Goffredo. 2010. Development and preliminary evaluation of a real-time polymerase chain reaction for the identification of *Culicoides obsoletus sensu strictu*, *C. scoticus* and *C. montanus* in the *Obsoletus* Complex in Italy. *Vet Ital* **46**:209-214, 215-220.
- Moon, K. L., S. L. Chown, and C. I. Fraser. 2019. Tandem host-parasite dispersal inferred from similarities in phylogeographical patterns among Little Penguins and their 'terrestrial' ectoparasites. *Journal of Biogeography* **46**:2520-2531.
- Moon, K. L., S. L. Chown, and C. I. Fraser. 2020. Local, but not long-distance dispersal of penguin ticks between two sub-Antarctic islands. *Frontiers of Biogeography* **12**.
- Moon, K. L., P. Dann, S. L. Chown, A. McGaughan, and C. I. Fraser. 2018. Penguin ectoparasite panmixia suggests extensive host movement within a colony. *The Auk* **135**:657-668, 612.

- Moore, M., M. Sylla, L. Goss, M. W. Burugu, R. Sang, L. W. Kamau, E. U. Kenya, C. Bosio, M. d. L. Munoz, M. Sharakova, and W. C. Black. 2013. Dual African Origins of Global *Aedes aegypti* s.l. Populations Revealed by Mitochondrial DNA. *Plos Neglected Tropical Diseases* **7**:e2175.
- Morel, P. 1981. Maladies à tiques du bétail en Afrique. Pages 471-717 *Précis de parasitologie vétérinaire tropicale*. Ministère de la Coopération et du Développement, République Française - Institut d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des pays Tropicaux.
- Morel, P. C. 1969. Ticks from Africa and the Mediterranean Basin. Cirad.
- Murray, M., and P. Kirkland. 1995. Bluetongue and Douglas virus activity in New South Wales in 1989: further evidence for long-distance dispersal of the biting midge *Culicoides brevitarsis*. *Australian Veterinary Journal* **72**:56-57.
- Nakao, R., J. W. Magona, L. Zhou, F. Jongejan, and C. Sugimoto. 2011. Multi-locus sequence typing of *Ehrlichia ruminantium* strains from geographically diverse origins and collected in *Amblyomma variegatum* from Uganda. *Parasites & Vectors* **4**:137.
- Nene, V. 2009. Tick genomics - coming of age. *Frontiers in Bioscience* **14**:2666-2673.
- Noel, V., E. Leger, E. Gomez-Diaz, A. M. Risterucci, and K. D. McCoy. 2012. Isolation and characterization of new polymorphic microsatellite markers for the tick *Ixodes ricinus* (Acari, Ixodidae). *Acarologia* **52**:123-128.
- Nolan, D. V., S. Carpenter, J. Barber, P. S. Mellor, J. F. Dallas, A. J. Mordue, and S. B. Piertney. 2007. Rapid diagnostic PCR assays for members of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* species complexes, implicated vectors of bluetongue virus in Europe. *Veterinary microbiology* **124**:82-94.
- Nolan, D. V., J. F. Dallas, S. B. Piertney, and A. J. Mordue Luntz. 2008. Incursion and range expansion in the bluetongue vector *Culicoides imicola* in the Mediterranean basin: a phylogeographic analysis. *Med Vet Entomol* **22**:340-351.
- Nomikou, K., C. I. Dovas, S. Maan, S. J. Anthony, A. R. Samuel, M. Papanastassopoulou, N. S. Maan, O. Mangana, and P. P. C. Mertens. 2009. Evolution and Phylogenetic Analysis of Full-Length VP3 Genes of Eastern Mediterranean Bluetongue Virus Isolates. *Plos One* **4**:e6437.
- Norval, R. A. I., H. R. Andrew, C. E. Yunker, and M. J. Burridge. 1992. Biological processes in the epidemiology of heartwater. Pages 71-86 *in* B. Fivaz, T. Petney, and I. Horak, editors. *Tick vector biology. Medical and veterinary aspects*. Springer-Verlag, Berlin.
- Norval, R. A. I., B. D. Perry, M. I. Meltzer, R. L. Kruska, and T. H. Booth. 1994. Factors affecting the distributions of the ticks *Amblyomma hebraeum* and *A. variegatum* in Zimbabwe: implications of reduced acaricide usage. *Exp Appl Acarol* **18**:383-407.
- Nuttall, G. H. F. 1915. Observations on the Biology of Ixodidae. *Parasitology* **7**:408-456.
- Onyango, M. G., N. W. Beebe, D. Gopurenko, G. Bellis, A. Nicholas, M. Ogugo, A. Djikeng, S. Kemp, P. J. Walker, and J.-B. Duchemin. 2015a. Assessment of population genetic structure in the arbovirus vector midge, *Culicoides brevitarsis* (Diptera: Ceratopogonidae), using multi-locus DNA microsatellites. *Vet Res* **46**:108.
- Onyango, M. G., G. N. Michuki, M. Ogugo, G. J. Venter, M. A. Miranda, N. Elissa, A. Djikeng, S. Kemp, P. J. Walker, and J.-B. Duchemin. 2015b. Delineation of the population genetic structure of *Culicoides imicola* in East and South Africa. *Parasites & Vectors* **8**:660.
- Pagès, N., F. Muñoz-Muñoz, S. Talavera, V. Sarto, C. Lorca, and J. I. Núñez. 2009. Identification of cryptic species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in the subgenus *Culicoides* and development of species-specific PCR assays based on barcode regions. *Veterinary Parasitology* **165**:298-310.
- Patterson, N., P. Moorjani, Y. Luo, S. Mallick, N. Rohland, Y. Zhan, T. Genschoreck, T. Webster, and D. Reich. 2012. Ancient Admixture in Human History. *Genetics* **192**:1065-1093.
- Paupy, C., C. Brengues, B. Kamgang, J. P. Herve, D. Fontenille, and F. Simard. 2008. Gene flow between domestic and sylvan populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in North Cameroon. *J Med Entomol* **45**:391-400.
- Paupy, C., C. Brengues, O. Ndiath, C. Toty, J. P. Herve, and F. Simard. 2010. Morphological and genetic variability within *Aedes aegypti* in Niakhar, Senegal. *Infect Genet Evol* **10**:473-480.
- Perez-Eid, C. 2007. Les tiques : Identification, biologie, importance médicale et vétérinaire. Lavoisier.
- Peterson, B. K., J. N. Weber, E. H. Kay, H. S. Fisher, and H. E. Hoekstra. 2012. Double Digest RADseq: An Inexpensive Method for De Novo SNP Discovery and Genotyping in Model and Non-Model Species. *PLoS One* **7**:e37135.
- Petit, R. J., A. El Mousadik, and O. Pons. 1998. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology* **12**:844-855.

- Petney, T. N., I. G. Horak, and Y. Rechav. 1987. The ecology of the African vectors of heartwater, with particular reference to *Amblyomma hebraeum* and *Amblyomma variegatum*. *Onderstepoort J Vet Res* **54**:381-395.
- Phillips, B. L., G. P. Brown, and R. Shine. 2010. Life-history evolution in range-shifting populations. *Ecology* **91**:1617-1627.
- Pilgrim, J., S. Siozios, M. Baylis, G. Venter, C. Garros, and G. D. D. Hurst. 2021. *Cardinium* symbiosis as a potential confounder of mtDNA based phylogeographic inference in *Culicoides imicola* (Diptera: Ceratopogonidae), a vector of veterinary viruses. *Parasites & Vectors* **14**:100.
- Pili, E., L. Carcangiu, M. Oppo, and A. Marchi. 2010. Genetic structure and population dynamics of the biting midges *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus*: implications for the transmission and maintenance of bluetongue. *Med Vet Entomol* **24**:441-448.
- Pioz, M., H. Guis, D. Calavas, B. Durand, D. Abrial, and C. Ducrot. 2011. Estimating front-wave velocity of infectious diseases: a simple, efficient method applied to bluetongue. *Vet Res* **42**:60.
- Radwan, J., and W. Babik. 2012. The genomics of adaptation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **279**:5024-5028.
- Rafolo, A. 1987-1988. L'alimentation carnée chez les anciens malgaches. *Nouv. Centre Art Archéo.* **5-6**:22-26.
- Rageau, J., and J. Mouchet. 1970. Les tiques de la Camargue (Acarions: Ixodoidea) et leur rôle éventuel dans l'épidémiologie des arbovirus. *Folia Parasitologica* **17**:349-353.
- Reyes-Velasco, J., J. D. Manthey, Y. Bourgeois, X. Freilich, and S. Boissinot. 2018. Revisiting the phylogeography, demography and taxonomy of the frog genus *Ptychadena* in the Ethiopian highlands with the use of genome-wide SNP data. *PLoS One* **13**:e0190440.
- Rodhain, F., and C. Perez. 1985. *Precis d'entomologie medicale et veterinaire; notions d'epidemiologie des maladies a vecteurs.* Maloine, Paris France.
- Rodríguez-Sánchez, F., A. Hampe, P. Jordano, and J. Arroyo. 2010. Past tree range dynamics in the Iberian Peninsula inferred through phylogeography and palaeodistribution modelling: A review. *Review of Palaeobotany and Palynology* **162**:507-521.
- Ronce, O. 2007. How Does It Feel to Be Like a Rolling Stone? Ten Questions About Dispersal Evolution. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **38**:231-253.
- Rousset. 2000. Genetic differentiation between individuals. *Journal of Evolutionary Biology* **13**:58-62.
- Sailleau, C., G. Zanella, E. Breard, C. Viarouge, A. Desprat, D. Vitour, M. Adam, L. Lasne, A. Martrenchar, L. Bakkali-Kassimi, L. Costes, and S. Zientara. 2012. Co-circulation of bluetongue and epizootic haemorrhagic disease viruses in cattle in Reunion Island. *Veterinary microbiology* **155**:191-197.
- Sands, A. F., D. A. Apanaskevich, S. Matthee, I. G. Horak, A. Harrison, S. Karim, M. K. Mohammad, K. Y. Mumcuoglu, R. S. Rajakaruna, M. M. Santos-Silva, and C. A. Matthee. 2017. Effects of tectonics and large scale climatic changes on the evolutionary history of *Hyalomma* ticks. *Mol Phylogenet Evol* **114**:153-165.
- Sarto i Monteys, V., D. Ventura, N. Pages, C. Aranda, and R. Escosa. 2005. Expansion of *Culicoides imicola*, the main bluetongue virus vector in Europe, into Catalonia, Spain. *The Veterinary record* **156**:415-417.
- Schlötterer, C., and T. Wiehe. 1999. Microsatellite, a neutral marker to infer selective sweeps. Pages 238-248 in D. B. Goldstein and C. Schlötterer, editors. *microsatellites : evolutions and applications.* Oxford University Press, Oxford.
- Sedda, L., H. E. Brown, B. V. Purse, L. Burgin, J. Gloster, and D. J. Rogers. 2012. A new algorithm quantifies the roles of wind and midge flight activity in the bluetongue epizootic in northwest Europe. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **279**:2354-2362.
- Sedda, L., D. Morley, and H. E. Brown. 2015. Characteristics of Wind-Infective Farms of the 2006 Bluetongue Serotype 8 Epidemic in Northern Europe. *EcoHealth* **12**:461-467.
- Sedda, L., and D. J. Rogers. 2013. The influence of the wind in the Schmallenberg virus outbreak in Europe. *Scientific Reports* **3**.
- Seehausen, O., R. K. Butlin, I. Keller, C. E. Wagner, J. W. Boughman, P. A. Hohenlohe, C. L. Peichel, G.-P. Saetre, C. Bank, Å. Brännström, A. Brelsford, C. S. Clarkson, F. Eroukhmanoff, J. L. Feder, M. C. Fischer, A. D. Foote, P. Franchini, C. D. Jiggins, F. C. Jones, A. K. Lindholm, K. Lucek, M. E. Maan, D. A. Marques, S. H. Martin, B. Matthews, J. I. Meier, M. Möst, M. W. Nachman, E. Nonaka, D. J. Rennison, J. Schwarzer, E. T. Watson, A. M. Westram, and A. Widmer. 2014. Genomics and the origin of species. *Nature Reviews Genetics* **15**:176-192.
- Sellers, R. F., D. E. Pedgley, and M. R. Tucker. 1977. Possible spread of African horse sickness on the wind. *Journal of Hygiene* **79**:279-298.

- Sghaier, S., S. Hammami, M. Goffredo, M. Hammami, O. Portanti, A. Lorusso, G. Savini, and J. C. Delécolle. 2017. New species of the genus *Culicoides* (Diptera Ceratopogonidae) for Tunisia, with detection of Bluetongue viruses in vectors. *Vet Ital* **53**:357-366.
- Shults, P., A. Ho, E. M. Martin, B. L. McGregor, and E. L. Vargo. 2020. Genetic Diversity of *Culicoides stellifer* (Diptera: Ceratopogonidae) in the Southeastern United States Compared With Sequences From Ontario, Canada. *Journal of medical entomology* **57**:1324-1327.
- Sprygin, A. V., O. A. Fiodorova, Y. Y. Babin, N. P. Elatkin, B. Mathieu, M. E. England, and A. V. Kononov. 2014. *Culicoides* biting midges (Diptera, Ceratopogonidae) in various climatic zones of Russia and adjacent lands. *Journal of Vector Ecology* **39**:306-315.
- Stachurski, F., and H. Adakal. 2010. Exploiting the heterogeneous drop-off rhythm of *Amblyomma variegatum* nymphs to reduce pasture infestation by adult ticks. *Parasitology* **137**:1129-1137.
- Stachurski, F., and R. Lancelot. 2006. Footbath acaricide treatment to control cattle infestation by the tick *Amblyomma variegatum*. *Medical and Veterinary Entomology* **20**:402-412.
- Stachurski, F., P. Tortosa, P. Rahajarison, S. Jacquet, A. Yssouf, and K. Huber. 2013. New data regarding distribution of cattle ticks in the south-western Indian Ocean islands. *Veterinary Research* **44**.
- Stachurski, F., and L. Vial. 2018. Installation de la tique *Hyalomma marginatum*, vectrice du virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo, en France continentale. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* **84**:37-41.
- Sungirai, M., M. Madder, D. Z. Moyo, P. De Clercq, and E. N. Abatih. 2015. An update on the ecological distribution of the Ixodidae ticks in Zimbabwe. *Experimental and Applied Acarology* **66**:269-280.
- Sylla, M., C. Bosio, L. Urdaneta-Marquez, M. Ndiaye, and W. C. I. V. Black. 2009. Gene Flow, Subspecies Composition, and Dengue Virus-2 Susceptibility among *Aedes aegypti* Collections in Senegal. *Plos Neglected Tropical Diseases* **3**:e408.
- Tabachnick, W. J. 1991. Evolutionary genetics and arthropod-borne disease : the yellow fever mosquito. *American Entomologist* **37**:14-24.
- Tabachnick, W. J., L. E. Munstermann, and J. R. Powell. 1979. Genetic distinctness of sympatric forms of *Aedes aegypti* in East Africa. *Evolution* **33**:287-295.
- Tabachnick, W. J., and J. R. Powell. 1979. A world-wide survey of genetic variation in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Genetical Research* **34**:215-229.
- Taberlet, P., L. Fumagalli, A.-G. Wust-Saucy, and J.-F. Cosson. 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Mol Ecol* **7**:453-464.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**:585-595.
- Talavera, S., F. Muñoz-Muñoz, M. VerdÚN, and N. PagÈS. 2017. Morphology and DNA barcoding reveal three species in one: description of *Culicoides cryptipulicaris* sp. nov. and *Culicoides quasipulicaris* sp. nov. in the subgenus *Culicoides*. *Med Vet Entomol* **31**:178-191.
- Traore-Lamizana, M., H. Zeller, E. Molun, M. Mondo, J.-P. Hervy, F. Adam, and J. P. Digoutte. 1994. Dengue 2 outbreak in southeastern Senegal during 1990: virus isolations from mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* **31**:623-627.
- Uilenberg, G., H. Hoogstraal, and J. M. Klein. 1979. Les tiques (Ixodoidea) de Madagascar et leur rôle vecteur.
- Vachiéry, N., H. Jeffery, R. Pegram, R. Aprelon, V. Pinarello, R. L. Y. Kandassamy, M. Raliniaina, S. Molia, H. Savage, R. Alexander, M. Frebling, D. Martinez, and T. Lefrançois. 2008. *Amblyomma variegatum* Ticks and Heartwater on Three Caribbean Islands. *Ann N Y Acad Sci* **1149**:191-195.
- Van Houtte, N., A. Van Oosten, K. Jordaens, E. Matthysen, T. Backeljau, and D. Heylen. 2013. Isolation and characterization of ten polymorphic microsatellite loci in *Ixodes arboricola*, and cross-amplification in three other *Ixodes* species. *Experimental and Applied Acarology* **61**:327-336.
- Venail, R., T. Balenghien, H. Guis, A. Tran, M.-L. Setier-Rio, J.-C. Delécolle, B. Mathieu, C. Cêtre-Sossah, D. Martinez, and J. Languille. 2012. Assessing diversity and abundance of vector populations at a national scale: example of *Culicoides* surveillance in France after bluetongue virus emergence. Pages 77-102 *Arthropods as vectors of emerging diseases*. Springer.
- Vial, L., F. Stachurski, A. Leblond, K. Huber, G. Vourc'h, M. Rene-Martellet, I. Desjardins, G. Balanca, V. Grosbois, S. Pradier, M. Gely, A. Appelgren, and A. Estrada-Pena. 2016. Strong evidence for the presence of the tick *Hyalomma marginatum* Koch, 1844 in southern continental France. *Ticks and Tick-Borne Diseases* **7**:1162-1167.
- Voltzit, O. V., and O. B. Keirans. 2003. A review of African *Amblyomma* species (Acari, Ixodida, Ixodidae). *Acarina* **11**:135-214.

- Walker, A. R., A. Bouattour, J. L. Camicas, A. Estrada-Pena, I. G. Horak, A. A. Latif, R. G. Pegram, and P. M. Preston. 2003. Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species. *Bioscience Reports*.
- Walker, J. B., and A. Olwage. 1987. The tick vectors of *Cowdria ruminantium* (Ixodoidea, Ixodidae, genus *Amblyomma*) and their distribution. *Onderstepoort J Vet Res* **54**:353-379.
- Wallis, G. P., W. J. Tabachnick, and J. R. Powell. 1983. Macrogeographic genetic variation in a human commensal: *Aedes aegypti*, the yellow fever mosquito. *Genetical Research* **41**:241-258.
- Waples, R. S. 1989. A generalized approach for estimating effective population size from temporal changes in allele frequency. *Genetics* **121**:379-391.
- Wegmann, D., C. Leuenberger, S. Neuenschwander, and L. Excoffier. 2010. ABCtoolbox: a versatile toolkit for approximate Bayesian computations. *Bmc Bioinformatics* **11**.
- Werner, D., S. Groschupp, C. Bauer, and H. Kampen. 2020. Breeding Habitat Preferences of Major Culicoides Species (Diptera: Ceratopogonidae) in Germany. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **17**:5000.
- Wirth, W. W. 1990. The biting midges of Aldabra Atoll, Indian Ocean (Diptera : Ceratopogonidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington* **92**:230-247.
- Wirth, W. W., and D. H. Messersmith. 1977. Notes on the biting midges of the Seychelles (Diptera: Ceratopogonidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington* **79**:293-309.
- Xia, S., L. V. Cosme, J. Lutomiah, R. Sang, M. F. Ngangue, N. Rahola, D. Ayala, and J. R. Powell. 2020. Genetic structure of the mosquito *Aedes aegypti* in local forest and domestic habitats in Gabon and Kenya. *Parasites & Vectors* **13**:417.
- Zeller, H. G., M. Traore-Lamizana, E. Monlun, J. P. Hervy, M. Mondo, and J. P. Digoutte. 1992. Dengue-2 virus isolation from humans during an epizootic in southern Senegal in November, 1990. *Research in Virology* **143**:101-102.
- Zhang, D.-X., and G. M. Hewitt. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Mol Ecol* **12**:563-584.