

Problématique et enjeux de l'identification des espèces vectrices de la FCO en France

Denis Augot, Jérôme Depaquit

Afssa, Laboratoire d'études et de recherches en pathologie animale et zoonoses, Unité sous contrat Vecpar, Reims

La FCO est transmise aux mammifères par la piqûre d'insectes femelles appartenant au genre *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) [1]. Plus de 1 400 espèces de *Culicoides* sont connues dans le monde; dans une grande variété d'habitats, du bord de mer jusqu'à plus de 4000 mètres d'altitude et dans des régions tropicales, arctiques et subarctiques [1]. Moins d'1 % des 1 400 espèces décrites ont été incriminées dans la transmission de la FCO (voir encadré p. 8).

BIOLOGIE DES CULICOIDES [1]

Le cycle de vie des *Culicoides* se décompose en quatre étapes: l'œuf, quatre stades larvaires, un stade nymphal et un stade imaginal (adulte). Les sites de reproduction sont différents et spécifiques des espèces. Les stades immatures exigent une certaine quantité d'eau libre et/ou d'humidité et ces critères sont rencontrés dans une large gamme d'habitats: les bords de mares, d'étangs, de lacs voire de mer, les berges de ruisseaux et de sources, les sols marécageux, les tourbières, les trous d'arbres, les excréments d'animaux, des fuites au niveau des systèmes d'irrigation, des fruits en décomposition et des supports végétaux. L'écologie des *Culicoides* dépend étroitement des conditions climatiques (température, humidité) et des espèces considérées. En général, la durée de vie des adultes est courte (10-20 jours) mais ils peuvent vivre pendant des périodes plus longues, entre 1,5 et 3 mois, et peuvent ainsi prendre de multiples repas sanguins. En revanche, le processus de développement de l'œuf jusqu'au stade adulte compte environ 3 semaines (dépend des températures extérieures): œufs (2 à 9 jours); 4 stades larvaires (14 à 25 jours) et le stade nymphal (de 3 à 10 jours). La durée de la vie larvaire peut être allongée de plusieurs mois durant l'hiver dans les pays froids et tempérés, à amplitude thermique annuelle marquée. Les *Culicoides* ont une dispersion active très limitée de quelques centaines de mètres à 3 km au plus de leurs sites de reproduction. Outre un possible transport des larves, il existe une dispersion passive (par les vents) beaucoup plus importante: quelques dizaines à plusieurs centaines de kilomètres.

TAXINOMIE

La famille des *Ceratopogonidae* contient environ 125 genres avec environ 5 500 espèces. Parmi ces genres, quatre sont connus pour contenir des espèces hématophages: *Austroconops*, *Culicoides*, *Leptoconops* et *Forcipomyia* (sous-genre *Lasiohelea*). Les *Culicoides* sont différenciables des autres genres par des caractères antennaires et alaires [1]. La systématique du genre *Culicoides* repose exclusivement sur des caractères morphologiques. Les caractères sur lesquels s'appuie cette classification typologique sont principalement la pigmentation des ailes, la distribution des sensilles (organes sensoriels) sur les segments antennaires dans les deux sexes, la longueur de l'antenne et la morphologie des organes génitaux (genitalia) chez les mâles, le nombre et la taille des

spermathèques chez les femelles ainsi que l'indice antennaire [3]. L'identification spécifique des *Culicoides* est délicate et réservée aux trop rares spécialistes de ce groupe.

Le groupe *obsoletus*, très inféodé aux captures à l'intérieur des bâtiments agricoles, se compose dans notre pays de cinq espèces morphologiquement proches: *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. dewulfi*, *C. montanus* et *C. chiopterus*. Le groupe *pulicaris* est composé en France de 10 espèces: *C. pulicaris*, *C. lupicaris*, *C. flavipulicaris*, *C. newsteadi*, *C. punctatus*, *C. fagineus*,

Tableau 1. Liste des espèces de *Culicoides* signalées en France ([3], modifié)

Sous-genre	Espèces
<i>Avaritia</i>	<i>C. chiopterus</i> , <i>C. dewulfi</i> , <i>C. imicola</i> , <i>C. montanus</i> , <i>C. obsoletus</i> , <i>C. scoticus</i>
<i>Beltranmyia</i>	<i>C. circumscriptus</i> , <i>C. salinarius</i> , <i>C. sphagnumensis</i>
<i>Culicoides</i>	<i>C. deltus</i> , <i>C. fagneus</i> , <i>C. flavipulicaris</i> , <i>C. griseus</i> , <i>C. impunctatus</i> , <i>C. lupicaris</i> , <i>C. newsteadi</i> , <i>C. pulicaris</i> , <i>C. punctatus</i> , <i>C. subfagineus</i>
<i>MonoCulicoides</i>	<i>C. parroti</i> , <i>C. puncticollis</i> , <i>C. nubeculosus</i> , <i>C. riethi</i> , <i>C. stigma</i>
<i>PontoCulicoides</i>	<i>C. tauricus</i>
<i>SilvatiCulicoides</i>	<i>C. achrayi</i> , <i>C. fascipennis</i> , <i>C. pallidicornis</i> , <i>C. picturatus</i> , <i>C. subfascipennis</i>
<i>Synhelea</i>	<i>C. corsicus</i> , <i>C. semimaculatus</i>
<i>Wirthomyia</i>	<i>C. cameroni</i> , <i>C. minutissimus</i> , <i>C. riouxi</i> , <i>C. segnis</i> , <i>C. reconditus</i>

Groupes	Espèces <i>incertae sedis</i>
Groupe 1	<i>C. alazanicus</i> , <i>C. cataneii</i> , <i>C. duddingstoni</i> , <i>C. gejjelensis</i> , <i>C. jumineri</i> , <i>C. kibunensis</i> , <i>C. jurensis</i> , <i>C. kurensis</i> , <i>C. paradisionensis</i> , <i>C. riebi</i> , <i>C. simulator</i> , <i>C. vidourlensis</i>
Groupe 2	<i>C. begueti</i> , <i>C. haranti</i>
Groupe 3	<i>C. brunnicans</i> , <i>C. santonicus</i> , <i>C. vexans</i> , <i>C. albicans</i>
Groupe 4	<i>C. caucoliberensis</i> , <i>C. griseidorsum</i> , <i>C. maritimus</i> , <i>C. pictipennis</i> , <i>C. poperinghensis</i> , <i>C. submaritimus</i> , <i>C. univittatus</i>
Groupe 5	<i>C. clastrieri</i> , <i>C. festivipennis</i> , <i>C. paolae</i> , <i>C. shaklawensis</i>
Groupe 6	<i>C. dentriticus</i> , <i>C. furcillatus</i>
Groupe 7	<i>C. derisor</i> , <i>C. dzhafavori</i> , <i>C. malevillei</i>
Groupe 8	<i>C. indistinctus</i> , <i>C. odiatus</i>
Groupe 9	<i>C. longipennis</i>
Groupe 10	<i>C. truncorum</i> , <i>C. clintoni</i>
Groupe 11	<i>C. chaetophthalmus</i>
Groupe 12	<i>C. heliophilus</i> , <i>C. albihalteratus</i>

C. subfagineus, *C. grisescens*, *C. deltus*, et *C. impunctatus*. Ce groupe peut se subdiviser en divers sous-groupes, notamment à l'aide des caractères alaires. De façon générale, 79 espèces ont été signalées en France métropolitaine (Tableau 1).

À ce jour, aucune étude phylogénétique de niveau familial n'a été menée, que ce soit sur des caractères morphologiques ou moléculaires. Les seules approches phylogénétiques publiées intéressent des problématiques terminales, à visée épidémiologique, ciblées sur des groupes de vecteurs et visant à mettre éventuellement en évidence des populations individualisées, avec un éventuel corollaire sur la transmission d'agents infectieux.

Parmi les groupes les plus étudiés au niveau moléculaire, on retrouve les sous-genres *Avaritia* et *Culicoides*. Chez les *Avaritia*, outre la caractérisation de *C. imicola* en zone méditerranéenne, la problématique actuelle vise à caractériser moléculairement les espèces affines (c'est-à-dire des espèces très proches d'un point de vue morphologiques) d'Europe septentrionale appartenant à un complexe d'espèces: *C. obsoletus* s.s., *C. scoticus*, *C. dewulfi* et *C. chiopterus*. *C. montanus* est une espèce très rare, présente dans certaines localités du Sud du pays. Pour toutes ces espèces, l'identification des mâles est relativement aisée. Si l'identification des femelles de *C. dewulfi* et *C. chiopterus* est possible, notamment après montage, en revanche, celle des femelles de *C. obsoletus* s.s. et de *C. scoticus* est particulièrement délicate, voire impossible. Or, le groupe « *obsoletus* », qui contient uniquement *C. obsoletus* et *C. scoticus*, est probablement l'un des principaux vecteurs de la FCO en Europe septentrionale. Le principal caractère morphologique proposé [3] était l'espacement des plaques chitineuses au niveau de l'appareil génital (Figure 1).

Ce caractère a été largement remis en question par une étude moléculaire [4] individualisant parfaitement ces deux espèces mais dont la conséquence est l'attitude actuelle visant à ne pas différencier les femelles de ces deux espèces, mais à rendre pour celles-ci une identification « *C. obsoletus/scoticus* » notamment suite à une observation à la loupe binoculaire. Cette méthode est particulièrement rapide, vraisemblablement mieux adaptée au tri des espèces qu'à leur identification formelle. Le problème de l'identification précise de ces taxons dont le statut spécifique est à préciser demeure entier, ce qui est particulièrement gênant dans la mesure où il s'agit de l'un des principaux vecteurs de FCO en France.

Les études moléculaires actuelles se focalisent chez les *Culicoides* sur le séquençage de l'ADN mitochondrial (principalement la cytochrome C oxydase I- COI) et l'ADN ribosomal (espaces internes transcrits 1 et 2 – ITS 1 et ITS 2). L'ADN mitochondrial a été largement utilisé dans des études phylogénétiques, phylogéographiques et de génétique des populations. Le COI a été utilisé avec succès pour individualiser des espèces affines. Les ITS sont d'excellents marqueurs spécifiques et pour l'étude des relations phylogénétiques, notamment chez les insectes chez lesquels l'ITS 2 est souvent considéré comme le marqueur le plus intéressant [5].

FCO ET CULICOIDES

L'aire de répartition de la FCO, maladie à transmission vectorielle, dépend très étroitement de celle de ses vecteurs. Elle est comprise, jusqu'en 2005 entre 35° de latitude Sud et 40° de latitude Nord, et depuis 2006 au 55° de latitude Nord. La transmission de la FCO dans ces zones est saisonnière et a lieu, la plupart du temps, entre la fin de l'été

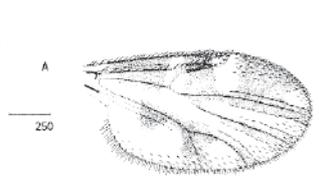
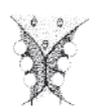
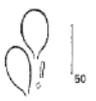
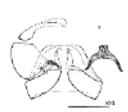
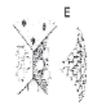
Espèce	Aile	Fossette sensorielle (3 segments palpe)	Yeux	Femelle		Mâle
				Spermathèque	Plaque chitineuse entourant l'orifice génital	Génitalia
<i>C. obsoletus</i>						
<i>C. scoticus</i>						
<i>C. chiopterus</i>						
<i>C. dewulfi</i>						

Figure 1. Principaux éléments de diagnose dans le sous genre *Avaritia* (d'après [3])

et la fin de l'automne, au moment où les vecteurs sont les plus abondants.

En Afrique et dans le Sud de l'Europe, *Culicoides imicola* a longtemps été considéré comme le seul vecteur compétent de la FCO. D'autres espèces sont des vecteurs prouvés ou putatifs de FCO : *C. dewulfi*, *C. chiopterus* et les groupes *obsoletus* et *pulicaris* [2]. *Culicoides chiopterus* a été mentionné comme un vecteur potentiel en France. Le rôle des espèces des groupes *obsoletus* et *pulicaris* dans la transmission de la FCO est réellement inquiétant car ces espèces sont communes et très répandues à travers toute l'Europe.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les principaux vecteurs suspectés ou identifiés dans la transmission de la FCO sont souvent capables de transmettre différents sérotypes : 2, 4, 8, 9 [2]. La détection du virus chez les *Culicoides* incriminés a été réalisée dans la plupart des cas à l'aide de techniques de biologie moléculaire (RT-PCR) à partir de lots supposés monospécifiques d'insectes préalablement identifiés morphologiquement sous la loupe binoculaire [2]. Cette technique est très intéressante sur le plan du rendement face à un virus dont la prévalence chez son vecteur est particulièrement faible, de l'ordre de 0,2 %, notamment en conditions naturelles [2]. Néanmoins, la limite de cette technique est d'informer de la présence d'ARN viral chez le *Culicoides*, et non pas de la présence du virus et de sa répllication qui ne peuvent être prouvées que par la mise en culture du virus. Force est de constater que face à une aussi faible prévalence, une mise en culture systématique du virus chez des *Culicoides* capturés *in natura* n'est pas réalisable en routine. Par ailleurs, dans la majorité des études, la recherche d'ARN viral s'effectue sur des lots souvent constitués d'un grand nombre d'individus. Dès lors se pose le problème de l'identité des insectes porteurs, *a fortiori* dans les groupes difficiles tel le groupe « *obsoletus* ».

Face à cet état de fait, il semblerait justifié dans l'avenir de procéder à une analyse individuelle des *Culicoides* capturés en conditions naturelles. Cette méthode coûteuse permettrait après un broyage initial dans un tampon de type PBS, d'analyser la moitié du broyat par RT-PCR et de congeler à -80 °C la seconde aliquote qui ne serait utilisée en vue de l'isolement du virus qu'en cas de positivité de la méthode moléculaire. Les automates les plus modernes permettant de traiter 384 individus simultanément ouvrent clairement cette perspective permettant un typage moléculaire systématique du vecteur. Cependant, si l'on se tourne vers cette voie de type « *barcode of life* », c'est-à-dire développement d'un « code à barres d'ADN » comme outil standard d'identification, (site internet du CBOL : <http://barcoding.si.edu/>) pour laquelle il existe des données considérables, il faut garder présent à l'esprit que les bases de données doivent être au préalable parfaitement validées afin de prendre en compte des espèces peu abondantes ou non suspectées actuellement dans la transmission de la FCO. D'autre part, le typage par plusieurs marqueurs différents et complémentaires paraît important au regard du très grand polymorphisme de l'ITS 1 et de possibles phénomènes d'introgression⁽¹⁾ observés chez *C. impunctatus* [6].

Les résultats des études entreprises chez le couple *Triatominæ/Trypanosoma cruzi* [5] apportent des pistes de réflexion et d'étude pour le couple *Culicoides*/FCO, même si la biologie de ces insectes n'est pas comparable et leurs processus de spéciation probablement différents. Une réflexion sur la délimitation de l'espèce chez les *Culicoides* est une priorité. Cette réflexion doit s'accompagner d'études sur les modes de spéciation qui permettront de bien définir ce concept d'espèce et de caractériser les populations intraspécifiques qu'elles soient sympatriques ou allopatriques⁽²⁾. Cette spéciation est-elle due principalement à des phénomènes d'isolement géographique entraînant une différenciation morphologique ? Cette dernière apparaît-elle avant ou après que l'isolement reproducteur ou génétique ne survienne ? Le concept de sous-espèce doit-il être employé ? La mise en évidence de populations haplotypiques, en relation ou non avec un morphotype ou une origine géographique, ne peut répondre complètement à la caractérisation de ces populations sans le recours aux élevages et aux tentatives d'hybridation. Ce travail lourd est un frein aux transcriptions classificatoires des données phylogénétiques. Quelle est la place des phénomènes d'introgression dans les processus de spéciation chez les *Culicoides* ? Peu mis en évidence à ce jour, ils devraient être recherchés de manière plus systématique dans l'avenir. Leur dépistage repose sur l'analyse parallèle chez les mêmes individus de marqueurs ribosomiques ou nucléaires et mitochondriaux, ces derniers bénéficiant d'une transmission maternelle exclusive. La combinaison des approches systématique et écologique est fondamentale, notamment en ce qui concerne les préférences trophiques des imagos. Enfin, l'écologie larvaire est un domaine où les connaissances sont encore fragmentaires.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Mellor P.S., Boorman J., Baylis M. (2000). *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vector. Annual Review of Entomology, 45: 307-340.
- [2] Carpenter S., Wilson A., Mellor P.S. (2009). *Culicoides* and the emergence of bluetongue virus in northern Europe. Trends in Microbiology, 17(4):172-8.
- [3] Delécolle J.C. (1985). Nouvelle contribution à l'étude systématique et iconographique des espèces du genre *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) du Nord-Est de la France. Thèse d'Université. Université Louis Pasteur de Strasbourg UER Sciences Vie et Terre.
- [4] Pagès N., Sarto I., Monteys V. (2005). Differentiation of *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus* (Diptera: Ceratopogonidae) based on mitochondrial cytochrome oxidase subunit I. Journal of Medical Entomology, 42 (6): 1026-1034.
- [5] Mas-Coma S., Bargues M.D. (2009). Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. Acta Tropica, 110(2-3):112-36
- [6] Ritchie A., Blackwell A., Malloch G., Fenton B. (2004) Heterogeneity of ITS1 sequences in the biting midge *Culicoides impunctatus* (Goetghebuer) suggests a population in Argyll, Scotland, may be genetically distinct. Genome 47: 546-558.

(1) Dispersion naturelle des gènes d'une espèce à l'intérieur d'une autre espèce par hybridation interspécifique suivie ou non de rétrocroisements avec le parent local.

(2) Population sympatrique: population vivant dans un même lieu géographique. Population allopatrique: population vivant dans des zones géographiques distinctes.