

UNIVERSITE MONTPELLIER III-PAUL VALERY

Arts et Lettres, Langues et Sciences Humaines et Sociales

Département de Biologie-Écologie-Environnement

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PAUL VALERY - MONTPELLIER III

Discipline: **Biologie des Populations et Ecologie**

T H E S E

Présentée et soutenue publiquement le 12 octobre 2009 par

Najla DSOULI épouse AYMES

**Contribution à la phylogénie du genre *Stomoxys* (Diptera, Muscidae) et à la
phylogéographie de *Stomoxys calcitrans* (L. 1758)**

Sous la direction de

Professeur Gérard DUVALLET

MEMBRES DU JURY :

M. JACQUIET Philippe, Maître de Conférences HDR, École Nationale Vétérinaire de Toulouse (Rapporteur).

M. KHALLAAYOUNE Khalid, Professeur, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Maroc (Rapporteur).

Mme MANGUIN Sylvie, Directeur de Recherche, IRD, Montpellier (Examineur).

M. MICHAUX Johan, Chercheur qualifié FNRS, Université de Liège (Belgique) et Centre de Biologie et de Gestion des Populations, Montpellier (Examineur).

M. LUMARET Jean-Pierre, Professeur, Université Montpellier III (Président).



N° attribué par la bibliothèque

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de thèse, **Gérard Duvallet**, de m'avoir proposé ce sujet passionnant. Son intérêt pour mon travail de recherche et son support m'ont permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions.

Ce travail a été réalisé dans l'Equipe Ecologie des Arthropodes dans les Agrosystèmes Méditerranéens, laboratoire de Zoogéographie dirigé par **Jean Pierre Lumaret**. Merci à Jean Pierre pour ses encouragements constants et son aide.

Je voudrais remercier sincèrement les personnes qui ont accepté de se réunir pour juger ce travail. Les rapporteurs **Phillipe Jacquet** et **Khalid Khallaayoune**, les examinateurs **Sylvie Manguin**, **Johan Michaux** et **Jean-Pierre Lumaret**.

Je remercie particulièrement **Johan Michaux** qui a suivi mes travaux, pour toutes les fructueuses et passionnantes discussions, ses conseils et sa rigueur et pour sa participation dans mon jury de thèse

Je tiens à remercier **Frédéric Delsuc** qui m'a beaucoup appris sur la datation moléculaire et qui m'a beaucoup aidé, dans la réalisation de ce travail. Sa gentillesse et son intérêt, m'ont été d'un grand secours pour ce parcours initiatique à la recherche.

Un grand merci à **Eric De Stordeur** pour sa collaboration au laboratoire de biologie moléculaire et aussi pour sa bonne humeur.

J'adresse mes vifs remerciements à **Michel Bertrand**, **Nassera Kadiri** et **Anne Emmanuelle Félix** pour nos intéressants débats autour du café et leur soutien.

J'ai une pensée pour tous ceux qui m'ont entouré pendant ces quatre ans de thèse : **Pierre**, **Martine**, **Joël**, **Jean-Noël**, **Alexandre**.... Merci pour leur esprit d'entraide et leur bonne ambiance.

Ce travail n'aurait jamais vu le jour sans les sacrifices continus, l'apport moral et matériel ainsi que l'amour éternel de ma famille. Je remercie également ma mère, mes sœurs, mon

frère et mes beaux parents, ainsi que mes amis, extérieurs au laboratoire, pour leur soutien et leurs encouragements.

Sur une note plus personnelle, j'aimerais remercier mon conjoint **Maxime Aymes**. Merci d'avoir été près de moi et de m'avoir encouragée durant les bons moments comme les plus difficiles.

Et enfin je tiens à dédier ma thèse à la mémoire d'**Alexandre Carron**. Paix à ton âme, simple et sincère!

À tous ceux et celles que j'ai oubliés et à toutes les personnes qui prendront le temps de lire cette thèse, merci!

SOMMAIRE

Introduction p1

Historique de la notion d'évolution.....	p4
1/Jean Baptiste Lamarck et le transformisme, <i>la vie se transforme</i>	p4
2/Darwin et la sélection naturelle, <i>la lutte pour l'existence</i>	p5
3/Néodarwinisme et synthèse moderne	p6
4/Stephen Jay Gould et Niles Eldredge : les équilibres ponctués	p7
5/Dawkins et le gène égoïste	p8
6/Sélection ou dérive.....	p8
7/Conclusion.....	p9

Problématique..... p11

Chapitre I : Présentation du modèle d'études : Les stomoxes p15

Introduction	p16
I- Description de <i>Stomoxys spp.</i>	p17
II- Rôle épidémiologique : impact sanitaire et économique	p18
III- Traits d'histoire de vie et écophysiologie	p20
IV- Dynamique des populations	p22
- Préférence trophique, comportement et dispersion	p22
- Activités	p23
V- Génétique et structure des populations	p24
VI- Piégeage.....	p25

Chapitre II : Phylogénie des stomoxes p27

Introduction	p28
--------------------	-----

Partie I:

First Contribution to Systematic relation among <i>Stomoxys</i> species (Diptera: Muscidae)	p29
- Introduction	p30
- Material and Methods	p31

- Characters and characters states.....	p33
- Results and discussion	p35
- Conclusion	p37

Partie 2 II :

Article 1

Combined mitochondrial and nuclear phylogenetic analyses support the paraphyly of the genus *Stomoxys* (Diptera: Muscidae) and suggest an Oriental origin of these parasitic flies p50

Discussion générale p77

Chapitre III : Phylogéographie de *Stomoxys calcitrans* p80

Article 2

Global population structure of the stable fly (*Stomoxys calcitrans*) inferred by mitochondrial and nuclear sequence data p82

Résumé des principaux résultats p109

Conclusion Générale et Perspectives p111

Glossaire..... p116

Références bibliographiques p124

Annexes p134

LISTE DES FIGURES

Chapitre I : Présentation du modèle d'études : Les stomoxes p15

- Figure 1. *S. calcitrans* (a) et *M. domestica*..... p16
- Figure 2. Le cycle de développement des stomoxes avec les différents stades p21
- Figure 3. Piège Alsynite p25
- Figure 4. Piège Vavoua (Photographie : G. Duvallet) p26

Chapitre II : Phylogénie des stomoxes p27

Partie I :

- Figure 1. Têtes de *S. calcitrans* (Linnaeus), *Haematobosca simulans* (Meigen) et *Haematobia irritans* p38
- Figure 2. Têtes de *Stomoxys calcitrans* p38
- Figure 3. Vue frontale et latérale de tête d'une mouche musciforme p39
- Figure 4. Vue dorsale et latérale de thorax chez les diptères p40
- Figure 5. Différents dessins thoraciques des espèces de *Stomoxys*..... p41
- Figure 6. Les ailes d'une mouche musciforme p42
- Figure 7. Cladogramme consensus strict le plus parcimonieux sans pondération, généré par PAUP et TNT p43
- Figure 8. Cladogramme consensus strict (11 nœuds), avec pondération à priori produit par TNT p44
- Figure 9. Cladogramme consensus strict, avec pondération à priori produit par TNT, montrant la distribution des caractères p45

Partie II :

- Figure 1. Arbre phylogénétique basé sur les séquences d'ITS2, généré par Inférence Bayésienne p68
- Figure 2. Arbre phylogénétique construit par Inférence Bayésienne par concaténation d'ADN mitochondrial et nucléaire..... p69
- Figure 3. Relation phylogénétique pour 23 taxons de diptères à partir des séquences d'ADN mitochondrial et nucléaire par la méthode d'inférence bayésienne p70
- Figure 4. Chronogramme résultant à partir de multidiivtime pour trois gènes combinés COI, Cyt-b et ITS2 p71

Figure 1. Arbre inféré par Maximum de Vraisemblance à partir des haplotypes de COI et de Cyt-b..... p93

Figure 2. Arbre inféré par Maximum de Vraisemblance à partir des ribotypes d'ITS2 p94

Figure 3. Réseau haplotypique à partir de l'ADN mt et ribotypique à partir d'ITS2, implémenté dans Arlequin v 3.0 p95

Figure 3. Suite p96

Figure 5. Distribution Mismatch des populations (a) afrotropicales (b) orientales et (c) Paléarctiques..... p101

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre I : Présentation du modèle d'études : Les stomoxes p15

Tableau 1 : Genres et nombre d'espèces dans la tribu des Stomoxyini (Zumpt, 1973) p16

Chapitre II : Phylogénie des stomoxes p27

Partie I:

Table 1: Matrice des espèces de Stomoxyini utilisées dans l'analyse cladistique..... p46

Partie II:

Table 1. Distribution des espèces mentionnée par Zumpt, 1973 p63

Table 2. Espèces étudiées, localités, et numéros attribués par Gene Bank p64

Table 3. Primers de COI, Cyt-b et ITS2 utilisés pour l'amplification et le séquençage p65

Table 4. Moyenne des fréquences nucléotidiques des gènes utilisés dans l'analyse et résultats de test ILD p66

Table 5. Estimation de la divergence évolutionnaire entre paires de séquences de l'ADN mitochondrial (COI and Cyt-b). p67

Chapitre III : Phylogéographie de *Stomoxys calcitrans* p80

Table 1. Echantillonnage de *S. calcitrans* p92

Table 2. Distribution des haplotypes partagés chez *S. calcitrans*, entre régions zoogéographiques..... p97

Table 3. Résultats de l'analyse AMOVA entre et au sein des populations de *S. calcitrans* à partir de COI / Cyt-b / ND1-16S..... p98

Table 4. Mesure de F_{st} chez *S. calcitrans*, entre régions zoogéographique. (a) pour Cyt-b (bas) et COI (haut). (b) pour ND1-16S (bas) and ITS2 (haut)..... p99

Table 5. Distances génétiques (K2P) de *S. calcitrans* entre régions zoogéographiques inférées par Cyt-b (bas) and COI (haut) p100

Table 6. Estimation des paramètres d'expansion des populations de *S. calcitrans* p100

Table 7. Indices génétiques au niveau des populations COI (I) et Cyt-b (II) p102

Table 8. Indices génétiques au niveau des populations ND1-16S (I) et ITS2 (II) p103

PUBLICATIONS ET TRAVAUX

➤ Publications

- **Dsouli, N.**, Younsi-Kabachii, H., Postic, D., Nouira, S., Gern, L. & Bouattour, A. (2006) Reservoir Role of Lizard *Psammodromus algirus* in Transmission Cycle of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato (Spirochaetaceae) in Tunisia. *Journal of Medical Entomology*, **43**, (4), 737-742.
- Gérard Duvallet et **Najla Dsouli**. Mouches piqueuses et tabanides. In *Epidémiologie des maladies parasitaires*, Ripert C. Ed., Éditions médicales internationales, Cachan, 2007.
- **Dsouli-Aymes, N.**, Mavoungou, J.F., De Stordeur, E. & Duvallet, G. (2009) Population structure and genetic diversity of *Stomoxys calcitrans* in a changing landscape. *Parasite*, **16**, (1), 37- 41.
- Pont, A.C. & **Dsouli, N.** A new species of *Haematobosca* Bezzi from Gabon (Diptera, Muscidae), *Studia Dipterologica*. Acceptée.
- **Dsouli-Aymes, N.**, Delsuc, F., Michaux, J., De Stordeur, E., Couloux, A., Veuille, M. & Duvallet G. Combined mitochondrial and nuclear phylogenetic analyses support the paraphyly of the genus *Stomoxys* (Diptera: Muscidae) and suggest an Oriental origin of these parasitic flies. Soumis à *Systematic Entomology*.
- **Dsouli-Aymes, N.**, Michaux, J., De Stordeur, E., Couloux, A., Veuille, M. & Duvallet, G. Global population structure of the stable fly (*Stomoxys calcitrans*) inferred by mitochondrial and nuclear sequence data. En préparation.

➤ Communications

- Dsouli N.**, De Stordeur E., Duvallet G. (2007). Phylogénie du genre *Stomoxys* (Diptera : Muscidae), un groupe de vecteur peu connu. Congrès de la société française de parasitologie; Nice 13-14 décembre 2007.
- Duvallet G., Gilles J., Mavoungou J., **Dsouli N.** (2006). Les Stomoxes (Diptera : Muscidae): des vecteurs mal connus. VIème Conférence Internationale Francophone d'Entomologie; Rabat, Maroc, 2-6 juillet 2006.
- Duvallet G., Gilles J., Mavoungou J., **Dsouli N.** (2006). Les Stomoxes : des vecteurs mal connus. 1ères Journées Algéro-Françaises de Parasitologie; Alger 15-16 novembre 2006
- Dsouli N.**, M'ghirbi Y., Younsi H., Gern L., Nouira S., Bouattour A. (2004). Etude du rôle réservoir des lézards dans le cycle de transmission de *Borrelia* à El Jouza. 15èmes Journées de l'Association Tunisienne des Sciences Biologiques; Sousse 18-31 mars 2004.

- M'ghirbi Y., **Dsouli N.**, Postic D., Bouattour A. (2004). Détection et identification d'Ehrlichia sp et d'Anaplasma sp chez les tiques *Ixodidae* en Tunisie. 15èmes Journées de l'Association Tunisienne des Sciences Biologiques; Sousse 18-31 mars 2004.

➤ Formation aux techniques de biologie moléculaire et encadrement au laboratoire à Montpellier des étudiants suivants:

Venant de Thaïlande:

- Rounthip Mameatathip, PhD, Characterization of *Stomoxys* spp. (Diptera : Muscidae) populations in Central Thailand;

- Krajana Tainchun, MSc;

- Vithee Muenworm, MSc.

Venant du Maroc:

- Younes Loukhnati, thèse vétérinaire;

- Soumia N'mila, thèse vétérinaire.

Introduction

Le genre *Stomoxys* (Diptera, Muscidae, Stomoxyini) comprend 18 espèces reconnues à ce jour (Zumpt, 1973). Une seule est cosmopolite, *S. calcitrans* (L., 1758) alors que les 17 autres ont une répartition plus tropicale. Initialement orienté vers l'étude des facteurs qui ont permis à *S. calcitrans* de prospérer et de survivre dans des climats très variés, notre travail s'est rapidement orienté vers une étude phylogénétique du genre *Stomoxys* Geoffroy, 1762 qui permettrait de comprendre l'origine de ces mouches, et une étude phylogéographique de l'espèce cosmopolite qui permettrait de comprendre par quelles voies elle a envahi le monde. Notre travail se situe donc clairement dans le cadre de la théorie de l'évolution.

« La vie a une histoire »

"The affinities of all the beings of the same class have sometimes been represented by a great tree... As buds give rise by growth to fresh buds, and these if vigorous, branch out and overtop on all sides many a feebler branch, so by generation I believe it has been with the great Tree of Life, which fills with its dead and broken branches the crust of the earth, and covers the surface with its ever branching and beautiful ramifications."

Charles Darwin, 1859

Historique de la notion d'évolution

L'histoire de la vie a débuté il y a quelque 3,7 milliards d'années. L'évolution rend compte de son origine et des liens de parenté entre les individus. Aristote (384-322 avant J.-C.) pensait que les êtres vivants naissaient d'organismes identiques, ou qu'ils apparaissaient spontanément de la matière inerte. La "*génération spontanée*", transmise par plusieurs générations de prestigieux scientifiques et penseurs, fut longtemps considérée comme la seule explication logique. C'était la nature qui était responsable de l'organisation de la matière sous la direction divine. Ce n'est que bien plus tard, dans la seconde moitié du seizième siècle, que l'esprit critique des scientifiques de l'époque associé à une observation plus méthodique de la nature allaient progressivement favoriser l'essor des sciences dites "exactes".

En 1859, Charles Darwin publia un livre intitulé "L'origine des espèces". La thèse de Darwin rompait définitivement avec l'idée des générations spontanées en proposant une évolution *lente* et *progressive* des espèces qui descendent les unes des autres. Cette position devint, au cours des années 1930, le **néo-darwinisme** avec le rapprochement du principe de sélection naturelle de Darwin et du principe héréditaire initialement proposé par Grégor Mendel. La découverte de la structure de l'ADN par les américains Watson et Crick, en 1953, a abouti ensuite à ce qu'il convient d'appeler la **théorie synthétique** de l'évolution. Celle-ci représente aujourd'hui la pensée dominante au sein de la communauté scientifique. Pourtant, cette théorie a fait l'objet de nombreuses controverses : la théorie **des équilibres ponctués** ou celle de la **théorie du gène égoïste** en sont deux exemples.

La théorie de l'évolution rejette les dogmes fixistes, fondés essentiellement sur les textes religieux, selon lesquels les espèces vivantes sont immuables et n'ont pas changé depuis leur apparition.

1/ Jean Baptiste Lamarck et le transformisme, *la vie se transforme* :

« Je pourrais prouver que ce n'est point la forme du corps, soit de ses parties, qui donne lieu aux habitudes, à la manière de vivre des animaux ; mais que ce sont au contraire les habitudes, la manière de vivre et toutes les circonstances influentes qui ont avec le temps constitué la forme des animaux » Jean Baptiste Lamarck Discours Inaugural de 1800 au Muséum national d'histoire Naturelle

La *Philosophie zoologique* (1809) de Lamarck compte parmi les classiques de l'histoire des sciences puisqu'il représente l'acte de naissance du transformisme. Dans cet ouvrage, le temps fait son entrée dans l'étude des êtres vivants, et tout d'abord dans leur classification qui doit être généalogique. Cet ouvrage peut être également considéré comme le texte fondateur de la biologie. C'est incontestablement Lamarck qui va être le premier à systématiser l'idée d'une transformation des espèces et à en donner un exposé cohérent.

Lamarck considère que les êtres vivants les plus simples apparaissent par génération spontanée. La simplicité d'organisation leur permet d'apparaître spontanément. A partir de ces êtres très simples, se forment des êtres un peu plus complexes, bénéficiant de l'organisation des premiers qui leur a été transmise. A partir d'eux s'en forment d'autres encore plus complexes, et ainsi de suite, jusqu'à ce que soient formés des êtres vivants aussi compliqués que l'homme. La tendance à la complexification apparaît comme une force poussant les êtres vivants à la meilleure occupation possible de leur milieu extérieur. A un système nominaliste et artificiel de classification, Lamarck veut substituer ce qu'il appelle l'ordre de la nature, et qui n'est rien d'autre que l'ordre dans lequel les espèces sont nées les unes des autres au cours des siècles.

Selon Lamarck, la modification des circonstances entraîne une modification des besoins de l'animal, qui entraîne une modification des actions satisfaisant ces besoins, laquelle, si elle devient habituelle, finit par modifier le corps.

2/ Darwin et la sélection naturelle, la lutte pour l'existence :

"si lente que puisse être la marche de la sélection, puisque l'homme ne peut, avec ses faibles moyens, faire beaucoup par sélection artificielle, je ne vois aucune limite à l'étendue des changements, à la beauté et à l'infinie complication des coadaptations entre tous les êtres organisés, tant les uns avec les autres, qu'avec les conditions physiques dans lesquelles ils se trouvent, qui peuvent, dans le cours des temps, être effectuées par la sélection naturelle, ou la survivance des plus aptes" (Darwin, 1876).

A la fin de l'année 1831, Charles Darwin s'embarqua à bord du Beagle pour un voyage autour du monde. La visite de l'archipel des Galápagos fut pour lui l'occasion d'assister en grandeur nature au processus de l'évolution (Darwin, 1868) : l'observation attentive de la faune et la flore des îles Galápagos a amené Darwin progressivement vers l'évolutionnisme. Le grand naturaliste était d'autre part frappé par l'étonnante diversité des races d'oiseaux

artificiellement mises au point par les éleveurs. En se renseignant sur le sujet, Darwin apprend qu'à l'origine, une population de pigeons sauvages présente une certaine variabilité : certains ont le cou plus long, d'autres des plumes plus colorées, par exemple. L'éleveur va sélectionner préférentiellement les oiseaux qui lui conviennent le mieux, et va les faire se reproduire entre eux. En répétant ce processus sur de nombreuses générations, il finit par obtenir des pigeons très proches du type qu'il désirait à partir d'une souche sauvage.

Dans la première édition de l'origine des espèces, Darwin n'emploie le mot évolution que très peu, il préfère l'expression 'descendance modifiée'. Pour Darwin, tous les organismes sont issus d'un prototype inconnu ayant vécu dans des temps lointains. L'expression descendance signifie que de nouvelles espèces descendent d'une même espèce qui a accumulé des mutations à cause d'une adaptation nécessaire à différents milieux. Les espèces ayant des ancêtres communs présentent des similitudes, même si les caractères n'ont pas la même fonction (Darwin, 1876).

Les êtres vivants se transforment donc au rythme des fluctuations du milieu. Lorsqu'il y a une migration, un changement de niche écologique ou une fluctuation de l'environnement, les populations vont à nouveau se modifier pour améliorer leur adaptation.

3/Néodarwinisme et synthèse moderne

Si Charles Darwin avait proposé sa théorie sur l'évolution des espèces, il n'avait pas pu démontrer le mécanisme de l'hérédité des variations. Gregor Mendel (1907) va, le premier, expliquer la transmission des caractères innés. Mais c'est à partir de 1930 que la synthèse de l'évolution va s'élaborer, grâce aux apports de la biologie, de la géologie et de l'analyse mathématique.

Dans son ouvrage "*La génétique et l'origine des espèces*", **Theodosius Dobzhansky** (1937) considérait que tous les phénomènes évolutifs résultent de changements dans les fréquences de gènes au sein des lignées, sous l'action de la sélection naturelle. En 1942, **Ernst Mayr** dans son livre "*La systématique et l'origine des espèces*" présente le point de vue des systématiciens sur le principe d'évolution darwinienne. En 1944, le paléontologue **Georges Gaylord Simpson** publie "*Rythmes et modalités de l'évolution*". Il reprend la conception darwinienne d'un changement continu et lent des espèces, et interprète l'absence d'intermédiaires (les lignées sont incomplètes) par le manque d'archives paléontologiques. C'est le cumul de ces ouvrages dans trois disciplines différentes qui va jeter les bases de la **théorie synthétique**. On la nomme également **néodarwinisme**.

La théorie synthétique peut être résumée par trois idées essentielles :

1. l'évolution est le fruit d'une modification progressive et continue des êtres vivants au cours des générations;
2. la reproduction implique une hérédité : le matériel héréditaire (les gènes) subit, au niveau moléculaire, des modifications par mutations, aboutissant ainsi à une grande diversité. Le changement évolutif par mutation peut se faire de deux façons : l'**anagenèse** (une lignée descendante remplace une lignée ancestrale dans la continuité) et la **cladogenèse** (une lignée ancestrale se scinde en deux lignées descendantes);
3. le mécanisme central est la sélection naturelle qui opère au niveau des populations en sélectionnant les individus les mieux adaptés à leur environnement.

4/ Stephen Jay Gould et Niles Eldredge : les équilibres ponctués

S'appuyant sur la théorie de Darwin, Niles Eldredge et Stephen Jay Gould ont avancé, en 1972, une théorie selon laquelle les espèces n'évoluent pas graduellement, mais restent stables pendant de longues périodes et ponctuées par des phases de modifications très rapides comme la spéciation ou les extinctions. Cette alternance de stabilités et de discontinuités fut baptisée « **équilibres ponctués** ».

En se basant sur l'analyse du registre fossile de différents groupes taxonomiques, la théorie des équilibres ponctués propose que :

- une espèce apparaît, à l'échelle des temps géologiques et dans les enregistrements sédimentaires, en un temps géologiquement souvent assez court pour que le déroulement de la spéciation ne puisse pas être enregistré dans les sédiments (ponctuation) ;
 - une fois apparue (c'est-à-dire morphologiquement discernable des autres espèces et en particulier de l'espèce ancestrale), la nouvelle espèce reste inchangée durant toute son existence (stase), existence beaucoup plus longue que l'épisode de spéciation, puis s'éteint (après avoir éventuellement donné naissance à d'autres espèces) ;
 - la spéciation de type ponctuée est un phénomène de cladogenèse et de diversification : elle aboutit à une nouvelle espèce, distincte de l'espèce ancestrale, sans que cette dernière ne disparaisse : l'espèce-fille et l'espèce-mère peuvent coexister dans le temps et dans l'espace.
- Cette nouvelle conception de la spéciation n'est pas opposée à la spéciation darwinienne, souligne Gould, puisqu'elle peut très bien se dérouler en plusieurs centaines ou millions d'années, donc paraître lente et graduelle à l'échelle humaine et à l'échelle des générations

successives des organismes. Mais cette durée est suffisamment faible, géologiquement, pour se trouver entièrement représentée dans un seul joint de stratification (Gould, 1988).

5/ Dawkins et le gène égoïste :

"Nous sommes des machines destinées à assurer la survie des gènes, des robots programmés de façon aveugle pour transporter et préserver les molécules égoïstes appelées gènes" (Dawkins, 1978).

La théorie du gène égoïste de Richard Dawkins et Georges Willials apparait diamétralement à l'opposé de la sélection hiérarchique défendue par Gould : elle propose que les entités réellement sélectionnées, les véritables « cibles » de la sélection naturelle, sont les gènes et non les organismes. Ainsi, les organismes ne servent que de « véhicules » transitoires aux gènes.

Selon Dawkins, la véritable utilité de la vie telle que nous l'observons est la survie des molécules d'ADN. L'hypothèse de l'égoïsme des gènes explique tous les comportements des êtres vivants, sans exception. Dans un univers fait d'électrons et peuplé de gènes égoïstes, seules les longues chaînes d'ADN tentent de survivre en nous imposant leurs lois. Bien que scientifiquement séduisante, cette perspective se heurte à certaines difficultés conceptuelles. Une telle approche, centrée sur le rôle du code génétique, minimise l'importance de tous les autres processus. En particulier, la sélection naturelle qui opère sur les individus et non directement sur les gènes. Dawkins a la plume d'un darwiniste qui considère que l'évolution est une lutte pour l'existence et cela au niveau le plus bas, celui des molécules.

6/ Sélection ou dérive

Malgré le fait que la théorie synthétique représente une perspective largement admise, le débat reste ouvert à de nombreuses controverses.

En travaillant sur le rôle du hasard comme facteur d'évolution, Motoo Kimura (1983) a modifié de manière notable la conception du processus d'évolution. Le premier rôle n'est plus tenu par la nécessité (comme chez Darwin), mais par le hasard. La théorie **neutraliste** de l'évolution, aussi appelée théorie de la **mutation** et de la dérive aléatoire est une rupture dans le monde darwinien. Selon Kimura, c'est le hasard qui gouverne l'évolution, et ce sont les espèces les plus chanceuses qui survivent.

Kimura (1983) explique que nos gènes sont de véritables usines où se produisent constamment des mutations, c'est-à-dire des erreurs de copie. C'est donc à ce stade qu'il convient d'expliquer l'évolution, et non pas à celui de la morphologie, comme l'avait fait Darwin. La plupart des mutations sont neutres au regard de la sélection naturelle. Elles sont le pur produit du hasard et se produisent chez toutes les espèces vivantes à peu près au même rythme, quel que soit l'environnement. Deux à trois pour cent sont véritablement utiles à la vie. Cela dépend en fait de la place de la mutation dans la séquence nucléotidique. Ces mutations sont sélectivement neutres car les différentes versions des protéines codées ne changent pas l'adaptabilité de l'organisme à son milieu de vie. Les mutations neutres sont des possibilités génétiques qui deviendront des réalités morphologiques que si le hasard les sélectionne.

L'une des implications de cette théorie est que l'évolution ne conduit pas forcément vers une complexification des organismes. Bien que certains ont perçu cette théorie comme anti-Darwinienne, Kimura et la plupart des biologistes évolutionnistes actuels s'accordent à dire que les deux théories sont compatibles. La théorie neutraliste ne renie pas le rôle de la sélection naturelle qui détermine le cours de l'évolution adaptative. En effet, dans cette théorie, la sélection naturelle perd son caractère de facteur évolutif prépondérant et devient un facteur parmi d'autres au nombre desquels on compte les facteurs stochastiques tels que la dérive génétique ou l'effet fondateur.

7/ conclusion

« Rien en biologie n'a de sens si ce n'est à la lumière de l'évolution » (Dobzhansky, 1937).

La théorie de l'évolution justifie les autres programmes de recherches de la biologie. En effet, les branches de la biologie, autres que l'étude de l'évolution, se rapportent à deux activités. La première, la systématique, consiste à décrire et classer les formes vivantes. La théorie de l'évolution justifie cette activité dans la mesure où la classification reflète les relations de parenté qui relient entre elles les espèces vivantes (la phylogénie). La deuxième activité consiste à expliquer des mécanismes de fonctionnement des êtres vivants.

L'évolution rend compte de la vie et des relations phylogénétiques entre les espèces. Elle définit les objets biologiques comme des éléments d'une histoire de filiation (une généalogie).

Pour reconnaître une espèce plusieurs critères peuvent être utilisés, de même plusieurs définitions existent pour la définir (biologique, phylogénétique...).

Problématique

Les changements planétaires apparaissent comme une grande menace pour tous les êtres vivants. Ces changements comprennent le changement climatique, mais aussi les changements de pratiques, les pollutions et les invasions biologiques. Les écologistes ont déjà observé des modifications importantes de la biodiversité (Thuiller *et al.*, 2005). Et les épidémiologistes redoutent des conséquences sur la santé humaine, en particulier avec une augmentation des maladies à transmission vectorielle (Samways *et al.*, 1999). Les entomologistes médicaux ont déjà mis en évidence pour certains insectes vecteurs de pathogènes : des modifications des aires de distribution, un accroissement de la longévité, de la durée d'activité et des taux de reproduction (Epstein, 2001). Le contrôle des populations de vecteurs est une arme privilégiée dans la lutte contre ces maladies. Cependant peu d'opérations de lutte anti-vectorielle sont, à ce jour, couronnées de succès. L'origine de ces échecs est souvent liée à une connaissance insuffisante du vecteur et de son environnement, à la résistance à un nombre croissant d'insecticides ou encore à une stratégie de lutte inadaptée. Il est évident que des recherches sur la caractérisation systématique, génétique, biogéographique et écologique sont fondamentales pour améliorer les stratégies et les méthodes de lutte contre ces arthropodes. Ainsi, la phylogénie nous permet d'appréhender la distribution contemporaine de ces espèces et de formuler des hypothèses concernant leurs histoires évolutives tout en précisant leur statut taxonomique.

Comme modèles d'insectes vecteurs, on a choisi les stomoxes (Diptera, Muscidae, Stomoxyini), qui seront présentés dans le chapitre suivant. Ce sont des vecteurs potentiels dont on verra l'impact sanitaire et économique, principalement sur l'élevage. Mais ce genre *Stomoxys* présente de plus des particularités en termes d'adaptation qui permettraient de répondre, au moins en partie, aux questions sur les changements planétaires. Ce genre comprend en effet 18 espèces reconnues (Zumpt, 1973), dont une seule *S. calcitrans* (L. 1758) a étendu son aire de distribution à l'ensemble des continents alors que toutes les autres espèces ont une distribution tropicale. A l'île de La Réunion par exemple, deux espèces sont présentes : *S. calcitrans* qui a colonisé l'ensemble de l'île, mais plus particulièrement les Hauts présentant un climat tempéré frais, alors que *S. niger* Macquart 1851 a colonisé les Bas (zone de plantations de canne à sucre) présentant un climat tropical. Pour cela, l'île de La Réunion est un véritable laboratoire naturel pour l'étude des mécanismes d'adaptation en jeu.

Objectifs et questionnement

Pour comprendre ces adaptations et évolutions, il était nécessaire d'avoir des informations précises sur l'origine de ces mouches. Cela a orienté notre travail vers une étude phylogénétique du genre *Stomoxys*, puis une étude phylogéographique de l'espèce cosmopolite *S. calcitrans*.

Les questions principales que nous nous sommes posées étaient les suivantes :

- Quel est le lien de parenté entre les différentes espèces du genre *Stomoxys* ?
- Comment ces espèces se sont-elles différenciées ?
- Quelle est l'origine géographique de *S. calcitrans* ?
- Quels sont les processus qui ont gouverné la distribution actuelle de *S. calcitrans* ?
- Peut-on retracer ses routes de migration à partir d'un foyer originel ?

Mon travail s'articule donc autour des points suivants :

1) Etude phylogénétique du genre *Stomoxys*, basée sur la morphologie et les séquences nucléotidiques afin de retracer son histoire évolutive. L'arbre phylogénétique construit sur des bases morphologiques sera comparé avec celui construit sur des bases moléculaires. Pour cette étude phylogénétique nous avons retenu le Cytb et le COI comme marqueurs mitochondriaux et l'ITS2 (Internal Transcribed Spacer) comme marqueur nucléaire ribosomal. Ce travail a concerné 3 espèces asiatiques provenant de Thaïlande (*S. sitiens* Rondani 1873, *S. bengalensis* Picard 1908, *S. indicus* Picard 1908), 6 espèces africaines (*S. transvittatus* Villeneuve 1916, *S. inornatus* Grünberg 1906, *S. niger* Macquart 1851, *S. omega* Newstead 1907, *S. pallidus* Roubaud 1911 et *S. varipes* Bezzi 1907) et *S. calcitrans* provenant des deux continents. A noter que Zumpt (1973) reconnaît deux sous-espèces au sein de l'espèce *S. niger* : *S. n. niger* et *S. n. bilineatus*.

2) Etude phylogéographique de l'espèce cosmopolite *S. calcitrans* pour comprendre sa distribution globale et ainsi pour produire un scénario biogéographique et historique de colonisation à partir de son foyer originel.

Actuellement, nous disposons au laboratoire de 10 espèces sur les 18 connues dans le monde, qui seront utilisées pour l'étude de la phylogénie du genre. Quant à l'étude

phylogéographique de l'espèce cosmopolite, on dispose d'un échantillonnage qui couvre tous les continents à l'exception de l'Australie (Amérique, Europe, Afrique et Océanie).

Chapitre I :
Présentation du modèle d'étude :
Les stomoxes

Introduction :

L'ordre des diptères comprend des familles d'insectes ayant un impact économique et sanitaire considérable (Culicidae, Simuliidae, Psychodidae, Tabanidae, etc). Parmi ces diptères, on trouve la famille des Muscidae, avec la sous-famille des Muscinae. La tribu des Stomoxyini, groupe peu étudié, représente un clade monophylétique a priori bien défini (Zumpt, 1973). Ce sont des mouches hématophages, ressemblant aux mouches domestiques, mais facilement reconnaissables grâce à leur appareil buccal adapté à la piqûre. Il s'agit d'un long proboscis (trompe rigide), porté horizontalement, dépassant la tête vers l'avant et capable de percer la peau (Fig.1).

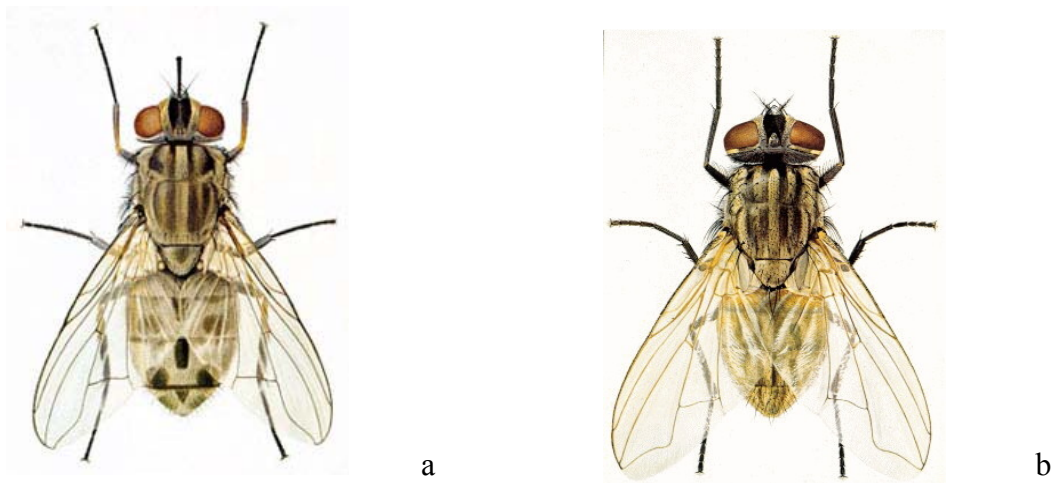


Fig.1 : *S. calcitrans* (a) et *M. domestica*.

La tribu des Stomoxyini comprend 10 genres (Tableau 1) révisés par Zumpt, dont les plus importants sont *Haematobosca* Bezzi (1907), *Haematobia* Lapeletier & Serville (1828) et *Stomoxys* Geoffroy (1762).

Genres	Nombre d'espèces décrites
<i>Rhinomusca</i> Malloch (1932)	2
<i>Neivamyia</i> Pinto & Fonseca (1930)	5
<i>Bruceomyia</i> Malloch (1932)	1
<i>Parastomoxys</i> Zumpt (1973)	1
<i>Prostomoxys</i> Zumpt (1973)	1
<i>Stygeromyia</i> Austen (1907)	2
<i>Haematobosca</i> Bezzi (1907)	12
<i>Haematobia</i> Lepeletier & Serville (1828)	6
<i>Haematostoma</i> Malloch (1932)	1
<i>Stomoxys</i> Geoffroy (1762)	18

Tableau 1 : Genres et nombre d'espèces dans la tribu des Stomoxyini (Zumpt, 1973)

I. Description de *Stomoxys* spp.

Le genre *Stomoxys* (Diptera, Muscidae, Stomoxyini), essentiellement hématophage, est associé au bétail, à la faune sauvage et parfois à l'homme. Il est impliqué dans la transmission de nombreux pathogènes. Ce genre se distingue des autres genres de la tribu des Stomoxyini par des palpes maxillaires mesurant approximativement un tiers du proboscis et par des antennes à arista ne portant des soies que sur la face dorsale. Le corps, de 3 à 10 mm de longueur, est légèrement velu à coloration terne. L'abdomen est grisâtre à jaunâtre avec des taches foncées irrégulières (Hewitt, 1910).

Le genre *Stomoxys*, originaire de l'Ancien Monde, inclut 18 espèces identifiées (Zumpt, 1973). Seule *S. calcitrans*, espèce anthropophile, a une distribution mondiale. Les autres espèces ont une distribution exclusivement tropicale (12 espèces sur le continent africain, 4 sur le continent asiatique et une espèce, *S. sitiens*, qu'on trouve à la fois sur le continent africain et le continent asiatique) (voir la carte de distribution, annexe A).

S. calcitrans est plus connu sous le nom de mouche des étables (stable fly en anglais), mais également de mouche charbonneuse, en raison de son rôle dans la transmission du charbon (Smith *et al.*, 1987).

Malgré l'importance du genre *Stomoxys*, aucun travail exhaustif relatif à ce groupe n'a été effectué depuis le travail de révision systématique de Zumpt (1973). Ce genre n'est connu

qu'à travers l'espèce cosmopolite *S. calcitrans*, qui est la plus étudiée. *S. niger* Macquart 1851 a fait l'objet de quelques études (Ramsamy, 1979 ; Charlwood & Sama, 1996 ; Garros *et al.*, 2004 ; Gilles *et al.*, 2005a, 2005b, 2005c), principalement sur l'île de La Réunion. Plus récemment, une étude préliminaire réalisée par Masmeatathip *et al.* (2006a, 2006b) décrit succinctement l'écologie de quelques espèces de *Stomoxys* en Thaïlande. Mavoungou *et al.* (2008) ont entamé une étude sur l'inventaire et l'écologie des stomoxes au Gabon. Au total, on ne possède pratiquement aucune information écologique concernant les espèces autres que *S. calcitrans*. La description de la répartition et de l'écologie connue des espèces de *Stomoxys* est montrée dans annexe B.

Dans sa monographie, Zumpt (1973) a suggéré une origine orientale pour *S. calcitrans* de la manière suivante : « As synanthropic fly *S. calcitrans* has gained world-wide distribution, the question of its original home has given rise to various speculations. For ecological reasons it is doubtful whether this was the temperate part of the Palaearctic region, more probably it was tropical parts of the Old World, and I suggest that the Oriental region has priority in this respect ». Cependant, Zumpt ne fournit aucune explication pour sa suggestion. Cette hypothèse est discutable, du fait qu'une origine afrotropicale de *S. calcitrans* est aussi envisageable du moment où 14 des 18 espèces connues du genre de *Stomoxys* sont présentes en Afrique et 12 d'entre elles sont situées seulement sur ce continent.

II. Rôle pathogène : impact sanitaire et économique

Les stomoxes prennent des repas de sang interrompus, changeant fréquemment d'hôtes au cours d'un même repas. Ce type de comportement a des conséquences épidémiologiques graves pour le bétail (Leclerq, 1971 ; Zumpt, 1973). Les stomoxes causent des pertes économiques importantes par leurs effets pathogènes directs (pertes de poids et de production laitière, baisse des défenses immunitaires) et par leur rôle dans la transmission de pathogènes (virus, bactéries, protozoaires et helminthes) (Campbell *et al.*, 1987; D'Amico *et al.*, 1996).

Parmi les **conséquences directes** de la présence des stomoxes autour du bétail, on cite l'anxiété induite par le harcèlement, une spoliation sanguine importante, une diminution des défenses immunitaires des animaux facilitant l'expression de maladies latentes. Les animaux présentent souvent des boiteries avec un gonflement et une raideur au niveau des articulations (Bishopp, 1913). En Illinois, Bruce & Decker (1958) ont mis en évidence une corrélation significativement positive entre l'abondance de *S. calcitrans* et la diminution de la production

de lait d'une part et de sa teneur en matière grasse d'autre part. Campbell *et al.* (1977) ont observé une réduction moyenne en gain de poids de 13% à 20% chez des veaux infestés par des stomoxes (50 à 100 mouches /animal). En 1987, Campbell *et al.* montrent qu'il est économiquement rentable de traiter les animaux à partir de 2 stomoxes présents par membre antérieur. Aux Etats-Unis, les pertes économiques infligées par les stomoxes à l'industrie du bétail sont évaluées à 100 millions de dollars (Foil & Hogsette, 1994).

Pour les **conséquences indirectes**, les stomoxes ont été impliqués dans la transmission de :

- **Virus**, tels que les *Capripoxvirus* (famille des *Poxviridae*) responsables de la dermatose nodulaire contagieuse, les *Bunyavirus* (*Bunyaviridae*) agents de la fièvre de la vallée du Rift (Hoch *et al.* 1985), les *Pestivirus* (*Flaviviridae*) responsables de la peste porcine africaine (Foil & Gorham, 2000) et les *Lentivirus* (*Retroviridae*) responsables de l'anémie infectieuse des équidés (Foil & Issel, 1991). En septembre 2007, à l'université du Montana (Etats-Unis), Greg Johnson a observé que des *S. calcitrans* se nourrissaient sur des oiseaux. Cette observation, et le fait que le virus West Nile a été trouvé chez ces mouches, suggère que *S. calcitrans* pourrait être impliqué dans l'amplification et/ou la transmission du virus West-Nile dans la colonie de pélicans étudiée (observation non encore publiée). Enfin, suite à des expérimentations conduites en laboratoire, Eigen *et al.* (2002) ont émis l'hypothèse de l'implication des stomoxes dans la transmission (le passage) du virus HIV des grands singes à l'homme.
- **Bactéries**, telles que *Anaplasma marginale*, agent causal de l'anaplasmose (Foil & Gorham, 2000), *Bacillus anthracis*, agent causal de l'anthrax ou fièvre charbonneuse (Chantal, 1997) et *Dermatophilus congolensis*, responsable de la dermatophilose (Richard & Pier, 1966; Foil & Gorham, 2000).
- **Parasites** (protozoaires et helminthes) : plusieurs espèces de stomoxes (*S. calcitrans*, *S. niger* et *S. taeniatus* Bigot 1888) sont capables de transmission mécanique de trypanosomes tels que *Trypanosoma evansi*, *T. brucei* et *T. vivax* (Mihok *et al.*, 1995a; D'Amico *et al.*, 1996). *S. calcitrans* serait aussi capable de transmettre des *Leishmania spp.* (Foil & Gorham, 2000), mais de nombreux spécialistes consultés en doutent. Il a été montré que *S. calcitrans* était aussi hôte intermédiaire d'helminthes du genre *Habronema*, parasites de la paroi stomacale des chevaux (Zumpt, 1973).

III. Traits d'histoire de vie et écophysiologie

Le cycle de développement des stomoxes comprend 6 stades : l'œuf, trois stades larvaires, la nymphe (ou pupa) et l'adulte (Ross *et al.*, 1982). Une fois les premiers repas sanguins pris et le développement ovarien réalisé, la femelle cherche un milieu adéquat pour déposer ses œufs.

L'œuf (environ 1 mm) éclot pour donner une jeune larve (stade L1); cette dernière va se développer et subir des transformations (stades L2 et L3). A la fin du stade L3, l'asticot s'immobilise dans la matière organique en décomposition ou sur le sol humide et se tasse sur lui-même. Le tégument se durcit, formant une enveloppe (le puparium) renfermant la nymphe qui va subir des modifications internes continues jusqu'à l'émergence du jeune imago (métamorphose complète). Après émergence, le tégument de l'imago prend sa coloration définitive en 30 minutes environ, le proboscis s'oriente vers l'avant et les ailes se déplient, permettant ainsi à la mouche de s'envoler (Castro, 1967; Itard *et al.*, 2000).

Les lieux de ponte et gîtes larvaires des *Stomoxys* sont très variés et correspondent à de la matière végétale en décomposition (tas de fumier, tas d'herbe, etc.). Ils sont souvent associés à de mauvaises conditions sanitaires et de mauvaise gestion des élevages (gestion des fourrages, des déchets alimentaires, des effluents et de l'ensilage) (Meyer & Peterson 1983). Ceci est vrai pour les espèces les plus connues, principalement *S. calcitrans* et *S. niger*. Les femelles de *S. calcitrans* et de *S. niger* se déplacent fréquemment pour disperser leurs œufs en petits lots un peu partout sur le milieu de ponte choisi (Foil & Hogsette, 1994). Pour *S. calcitrans*, la matière organique végétale et en décomposition, éventuellement mélangée à des déjections animales (fumier, herbes ou autres végétaux en décomposition, balles de foin stockées dans les champs...), constitue le site de ponte de prédilection (Barré, 1981 ; Lysyk, 1993). Les déjections pures d'animaux sont moins attractives (Zumpt, 1973 ; Foil & Hogsette, 1994). Le milieu de ponte doit être friable, poreux, avoir un fort taux d'humidité, et une température comprise entre 15 et 30°C (Hafez & Gamal-Eddin, 1959a). *S. niger* pond dans un substrat végétal en décomposition, notamment les amas de feuilles de cannes à sucres laissées sur le sol après la coupe (Kunz & Monty, 1976). Les lieux de ponte et les gîtes larvaires des autres espèces ne sont pas connus.

De nombreux travaux ont évalué l'**influence de la température** sur les traits d'histoire de vie de *S. calcitrans* (survie et temps de développement des immatures, longévité et reproduction

des adultes) (Berry *et al.*, 1976, 1977, 1978; Gilles *et al.*, 2005 a, 2005b; Kunz *et al.*, 1977; Lysyk & Krafur, 1993; Lysyk, 1995, 1998).

Chez *S. calcitrans*, la durée moyenne pour passer de l'œuf à l'adulte est inversement proportionnelle à la température, il faut plus de 60 jours à 15°C et moins de 12 jours à 30°C, la durée minimale a été observée à 31°C (Lysyk, 1998). Sutherland (1979) a montré que la température optimale d'incubation des œufs était de 30°C, et qu'une température de 45°C était létale.

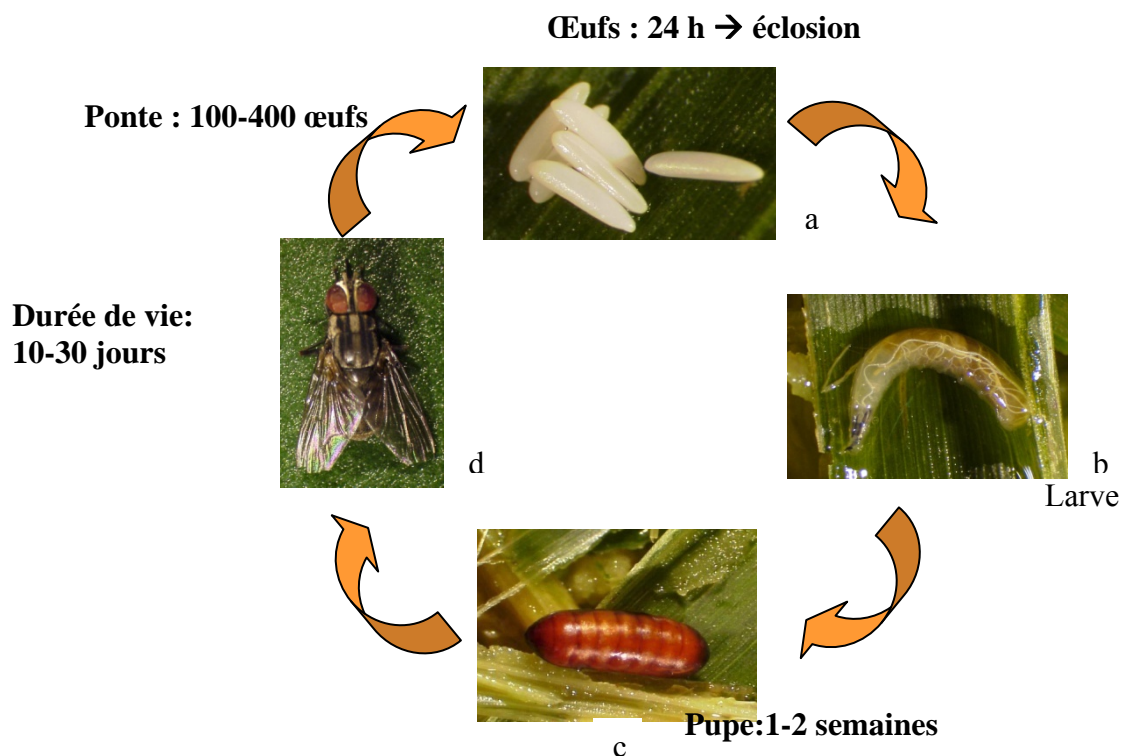


Fig.2 : Le cycle de développement des stomoxes avec les différents stades: a l'œuf (environ 1 mm), b la larve (au stade L3 mesurant jusqu'à 1 cm), c la pupe renfermant la nymphe (4 à 7 mm) et d l'imago.

Le comportement des larves de *S. calcitrans* a été bien étudié par Hafez & Gamal-Eddin (1961) et Berry *et al.* (1978). Les larves cherchent une humidité proche de la saturation, une température de 15 à 30°C et sont fortement attirées par l'odeur de fèces de cheval ou de vache, et de certains produits comme l'ammoniaque, l'éthylamine, la triméthylamine et l'acétone. A l'approche de la pupaison, les larves préfèrent une humidité de 75 à 83% et une température

de 15 à 25°C. Les nymphes de *S. calcitrans* tolèrent apparemment une température ambiante entre 20 et 30°C, mais la mortalité augmente considérablement hors de ces limites.

Globalement, Lysyk (1998) montre que la survie des immatures est maximale à 20-22°C. *S. calcitrans* semble passer l'hiver à tous les stades de développement (Somme, 1961; Berry *et al.*, 1978; Berkebile *et al.*, 1994) et se développe lentement dans des milieux permettant d'échapper aux basses températures (Somme, 1961; Lysyk, 1998).

Une récente étude, réalisée sur l'île de la Réunion par Gilles *et al.*, (2005b) sur *S. calcitrans* et *S. niger*, montre que la survie des immatures est similaire chez les deux espèces et dépend de la température, avec un optimum entre 20°C-25°C et une diminution très marquée à 15 et à 35°C. C'est le stade œuf qui est le plus sensible à 15°C et le stade pupes à 35°C. La survie des immatures est toujours plus élevée chez *S. calcitrans* que chez *S. niger*. La durée de développement des immatures est similaire chez les deux espèces, variant de 71 jours (15°C) à 13 jours (30-35°C) pour *S. calcitrans* et de 69 jours (15°C) à 14 jours (30-35°C) pour *S. niger*. Gilles *et al.*, (2005c), montrent également que la longévité des adultes est maximale à 15°C chez *S. calcitrans* et *S. niger*. Les traits concernant la reproduction varient aussi en fonction de la température. Chez les deux espèces, le nombre moyen d'œufs pondus par femelle diminue quand la température augmente ; la fécondité devient nulle à 35°C. Enfin, chez les deux espèces, le taux net de reproduction (R_0) (le nombre de femelles produites par femelle pendant une génération) augmente de 15 à 20°C puis décline de 20 à 30°C ; il devient nul à 35°C. Le temps de génération décroît quand la température augmente. Le taux d'accroissement naturel (r) augmente chez les deux espèces entre 15 et 30°C. Cependant, à 15°C il est positif chez *S. calcitrans* et négatif chez *S. niger*, alors que de 20 à 30°C il est plus élevé chez *S. niger* (Gilles *et al.*, 2005c). Ces données d'écophysiologie comparée permettent de comprendre comment l'espèce *S. calcitrans* a pu s'adapter aux régions froides en suivant l'homme dans ses pérégrinations.

IV. Dynamique des populations

Préférence trophique, comportement et dispersion :

Les stomoxes semblent être capables de parcourir de grandes distances à la recherche de nourriture et de conditions plus favorables (Bailey *et al.*, 1979). Hogsette *et al.* (1987) ont montré que des *S. calcitrans* avaient volé plus de 5 kilomètres à la recherche d'un repas de

sang. Des mouches marquées ont été retrouvées à 100 kilomètres de leur lieu de marquage, et même jusqu'à 225 kilomètres après le passage d'une tempête (Foil & Hogsette, 1994).

Selon les espèces et la saison, les stomoxes adultes s'approchent de leur hôtes préférentiels deux à trois fois quotidiennement pour prendre un repas de sang pendant 2 à 30 minutes (Hafez & Gamal-Eddin, 1959b; Kunz & Monty, 1976; Lysyk, 1995; Schofield & Torr, 2002). Généralement, les stomoxes préfèrent se nourrir sur les parties inférieures, en particulier les membres antérieurs, des animaux tels que les bovins, les chevaux, les porcs, les moutons et les ânes (Dougherty *et al.*, 1995). En effet, dans ces endroits, le pelage est plus fin et les vaisseaux sanguins sont plus proches de la surface de la peau. Durant la période de pullulation, les stomoxes peuvent également s'alimenter sur les flancs ou le dos de leurs hôtes (Hogsette *et al.*, 2008). Et, dans certaines conditions, les hommes peuvent également être attaqués comme sur les plages de Floride lors de pullulations (Hogsette *et al.*, 1981).

Les stomoxes femelles exigent plusieurs repas de sang afin d'accomplir leur fonction reproductrice (Jones *et al.*, 1992). Les mâles exigent au moins un repas de sang afin de produire le fluide séminal et d'inséminer une femelle avec succès (Foil & Hogsette, 1994). Jones *et al.* (1992) ont noté que les stomoxes adultes peuvent se nourrir sur le nectar de différentes fleurs, mais ce type de repas est insuffisant pour permettre la reproduction (Jones *et al.*, 1985).

Le nombre de *S. calcitrans* venant prendre un repas de sang est maximal entre 30°C et 32°C (Hafez & Gamal-Eddin, 1959b, Berry & Campbell, 1985).

Activités:

La majorité des stomoxes ont une activité journalière, uni- ou bimodale selon l'environnement. Cela a été en particulier établi pour *S. calcitrans* (Berry & Campbell, 1985; Gatehouse & Lewis, 1973; Kunz & Monty, 1976; Lysyk, 1995; Schofield & Brady, 1996). Cependant, Masmeatathip *et al.* (2006a) ont observé une différence d'activité entre *S. calcitrans* et les autres espèces de Thaïlande. Ainsi, *S. sitiens* et *S. indicus*, présentent un pattern d'activité principalement crépusculaire. Il a été déjà rapporté (Kano, 1953 cité par Zumpt, 1973) que *S. indicus* était active au crépuscule, et capturée plus aisément par des pièges lumineux.

Une étude récente (Mavoungou *et al.*, 2007) montre une activité diurne pour *S. calcitrans*, *S. n. niger*, *S. n. bilineatus*, *S. transvittatus* et *S. inornatus*. Mais *S. omega* a une activité crépusculaire, souvent bimodale.

L'activité des stomoxes varie probablement en fonction du paysage (forêt primaire, forêt secondaire et milieu anthropisé...), du climat (température, humidité et niveau du rayonnement solaire...), et de l'état physiologique des insectes (Simmond, 1944; Kangwagye, 1973; La Breque *et al.* 1975; Charlwood & Lopes, 1980; Mavoungou *et al.*, 2007). Cependant, ces études dépendent beaucoup de la méthode de piégeage utilisée.

Sur un transect village – forêt primaire, Mavoungou *et al.* (2007) ont montré que la composition de la communauté d'espèces de stomoxes dépendait du paysage : espèces anthropophiles près des villages, espèces « sauvages » en zones forestières. Les abondances les plus élevées ont été obtenues dans les zones de forêt secondaire, de bords de piste ou d'écotones forêt-savanes incluses.

V. Génétique et structure des populations

Au total, peu de recherches génétiques concernant les stomoxes ont été réalisées jusqu'à présent. Jones *et al.* (1991) et Krafur (1993) ont mesuré la variation d'allozymes de populations géographiquement dispersées aux Etats-Unis. Ils ont montré l'absence de différenciation génétique significative et donc l'existence d'un flux génique considérable entre ces populations de *S. calcitrans*. Ces résultats ont été confirmés par Szalanski *et al.* (1996) sur des populations du Nebraska, du Canada et du Texas, confirmant la faible différenciation géographique (et temporelle) entre les populations de *S. calcitrans*. Szalanski *et al.* (1996) et Jones *et al.* (1991) ont noté également que l'important flux génique compensait les différenciations locales existant à l'intérieur des populations de *S. calcitrans*. Plusieurs facteurs peuvent expliquer la faible variabilité génétique dans les populations de *S. calcitrans* aux Etats-Unis. Ce Muscidae a probablement été introduit en Amérique du Nord durant les 500 dernières années à partir de la région paléarctique (Marquez *et al.*, 2007). Et l'établissement de nouvelles populations en Amérique du nord a été certainement soumis à de forts goulets d'étranglement (Szalanski *et al.*, 1996).

Plus récemment, Gilles *et al.* (2005a) ont développé des marqueurs microsatellites fortement polymorphes chez *S. calcitrans* et *S. niger* sur l'île de la Réunion. Ces auteurs ont montré la présence d'un flux génique important chez *S. calcitrans* en dépit des barrières géographiques. Ils ont également montré l'absence de structuration génétique chez les populations de *S. niger* à l'échelle de l'île (Gilles *et al.*, 2007b).

Enfin, dans le cadre d'un projet d'étude dans les 13 parcs nationaux gabonais, une évaluation de l'impact de la fragmentation du paysage sur la diversité des populations de *S. calcitrans* a

été entamée, en utilisant la technique d'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) pour caractériser le polymorphisme intraspécifique (Dsouli-Aymes *et al.*, 2008). Ce travail cherchait à comparer des populations vivant en milieu fermé, supposé étanche aux flux de gènes (la forêt équatoriale du Gabon) et des populations vivant en milieu ouvert propice aux flux de gènes (la zone des Causses en France). Le résultat de ce travail est présenté en annexe C.

VI. Piégeage

Plusieurs types de pièges ont été proposés afin de contrôler les stomoxes. En premier lieu, il existe des pièges à colle utilisant comme support attractif l'Alsynite® (fibres de verre incorporées dans de la résine). Les stomoxes sont sensibles aux radiations émises par l'Alsynite dans le proche ultraviolet sous l'éclairement du soleil (Berry *et al.*, 1986). La découverte de ce type de pièges a considérablement amélioré la capture de *S. calcitrans*. Le premier piège à Alsynite utilisé fut le piège Williams (1973), qui consistait en deux panneaux placés verticalement à 1,35 m au-dessus du sol, enduits de glu et fixés ensemble par leur milieu. Le second fut le piège Broce (1988), composé d'un panneau d'Alsynite de forme cylindrique (Fig.3).



Fig.3 : Piège Alsynite.

En second lieu, il existe des pièges en tissu, utilisant la couleur bleue comme attractif visuel et un système de nasse pour récupérer les mouches. Ces pièges ont été initialement inventés pour les glossines en Afrique, ensuite ils se sont révélés efficaces dans la capture des

stomoxes (Mihok *et al.*, 1995b; Gilles *et al.*, 2007a). Ce type de piège se décline en de nombreuses variantes. Les plus utilisés sont le piège Vavoua (Fig.4) (Laveissiere & Grebaut, 1990) et le piège Nzi (Mihok, 2002). Ces pièges utilisent un tissu de couleur bleue phtalogène attractive pour ces mouches.



Fig.4 : Piège Vavoua (Photographie : G. Duvallet)

Des études ont été entreprises dans différents régions (Amérique du Nord, Afrique et île de La Réunion) pour tester l'efficacité des pièges et pour les comparer entre eux (Hogsette & Ruff, 1990; Gilles *et al.*, 2007a ; Taylor & Berkebile, 2006)

Chapitre II :
Phylogénie des stomoxes

Introduction

Depuis l'introduction de la théorie d'évolution, une des implications de la biologie consiste à étudier les relations phylogénétiques entre les espèces. Ceci est particulièrement important, parce que toutes les différences qui existent entre les espèces (morphologie, physiologie, écologie, comportement, ou répartition géographique) ont évolué, comme les espèces elles-mêmes, au cours de la phylogénèse. La recherche sur le lien phylogénétique entre toutes les espèces existantes est une mission de la systématique phylogénétique (Hennig, 1965).

La systématique phylogénétique ou cladistique est fondée par Willi Hennig en 1950 et a été largement développée au cours de ces trente dernières années. Elle propose de retrouver les parentés évolutives entre espèces en les rassemblant en groupes monophylétiques, c'est-à-dire en groupes comportant un ancêtre commun et la totalité des descendants. Pour cela, elle exploite avec un maximum de rigueur le concept darwinien de descendance avec modifications. Ainsi, le processus par lequel de nouvelles espèces vivantes apparaissent à partir d'espèces ancestrales est nommé « spéciation ». On distingue plusieurs types de spéciation, résultant de l'action de la sélection naturelle et de la dérive génétique. L'existence des espèces est donc une conséquence de la théorie de l'évolution.

Il existe trois écoles principales de classification qui se distinguent par la façon dont elles présentent l'évolution. L'école phénétique (ou taxinomie numérique) établit la hiérarchie selon la similarité globale entre les groupes qui reflète selon eux leur évolution. L'école phylogénétique classe les espèces en fonction de l'âge de leur plus proche ancêtre commun. L'école évolutive inclut dans sa classification des critères phénétiques et phylogénétiques. Le système le plus rigoureusement ancré dans la théorie de l'évolution reste le système phylogénétique (David & Samadi, 2000).

Aujourd'hui, la classification a pour objectif de retracer l'histoire évolutive ou l'histoire de spéciation des organismes au travers de l'établissement d'arbres phylogénétiques et d'estimer le temps de divergence entre les organismes depuis leur dernier ancêtre commun. Le chapitre suivant sera consacré à l'étude des relations phylogénétiques du genre *Stomoxys* sur des critères morphologiques et moléculaires et à l'élucidation de l'histoire évolutive de différentes espèces. Notre étude phylogénétique du genre *Stomoxys* sera exposée en deux sous chapitres sous formes d'articles. Le premier sous chapitre concerne les résultats de la phylogénie morphologique intitulé « First contribution to Systematic relation among *Stomoxys* species (Diptera : Muscidae) ». Cet article est en préparation, nous essayerons

d'améliorer ce travail en cherchant d'autres caractères morphologiques. Ensuite, la deuxième partie concerne les résultats de la phylogénie morphologique. Ce travail fait l'objet d'une publication soumise intitulée « Combined mitochondrial and nuclear phylogenetic analyses support the paraphyly of the genus *Stomoxys* (Diptera: Muscidae) and suggest an Oriental origin of these parasitic flies ».

First Contribution to Systematic relation among *Stomoxys* species (Diptera: Muscidae)
(En preparation)

Introduction

Understanding the history of flies is critically important in biology and medicine because of the sanitary or economically impact of species like fruit flies, mosquitoes, house flies, med flies. Comparative research on flies is built on the foundations of an understanding of their evolutionary trends and having a reliable phylogenetic tree.

There are approximately 5000 described species of Muscidae in some 170 genera and the family is amply represented in all biogeographic regions. The larvae are usually coprophagous, saprophagous or predaceous, while adults can be saprophagous, predaceous, haematophagous, nectarivorous or pollinivorous. Some species are of great medical and veterinary importance, acting as vectors of a number of pathogens, and other species are of considerable ecological importance. Because of the large number of species and genera, together with the recent explosive diversification of the family worldwide, there have been many different and often conflicting classifications and phylogenetic hypotheses proposed for the family (Malloch, 1934; Séguy, 1937; Hennig, 1965; Couri & Pont, 2000; De Carvalho & Couri, 2002; Couri & De Carvalho, 2003; Savage *et al.*, 2004; Kutty *et al.*, 2008).

Most of the descriptive and classificatory work on the Stomoxyini was carried out in the first half of the last century, especially by Malloch (1932a, b, c) and Zumpt (1938, 1939, 1940, 1950). The group was generally treated as a subfamily distinct from the Muscinae, and in his final work on the group, Zumpt (1973) recognized ten genera. Hennig (1965), in the first attempt at a phylogenetic classification of the Muscidae, placed the Stomoxyinae as the most apical subfamily and, because of the biting and blood-sucking feeding habit, suggested affinity with the Glossinidae and Pupipara. This was not generally accepted. De Carvalho (1989b) proposed a classification of the Muscidae based on a cladistic analysis of morphological characters of the adult, but with very few species. The resulting cladogram was used to propose a phylogenetic classification with seven subfamilies and eight tribes. He suggested, among other things, that the two subfamilies Muscinae and Stomoxyinae should be combined into a single subfamily Muscinae. The Muscini and Stomoxyini are now recognized as two sister-group tribes in the subfamily Muscinae, which is considered to be one of the most basal subfamilies (De Carvalho, 1989b; Couri & De Carvalho, 2003).

Currently, eight subfamilies are recognized (Achantipterinae, Atherigoninae, Azeliinae, Cyrtoneurinae, Coenosiinae, Muscinae, Mydaeinae, and Phaoniinae), but the subfamilies and tribes are still undergoing many classificatory changes (Couri & Pont, 2000; Couri & De Carvalho, 2003; Savage & Wheeler, 2004; Nihei & De Carvalho, 2007; Schuehli & De Carvalho 2005; Kutty *et al.*, 2008).

Species of the Stomoxyini are closely associated with mammals and are easily recognized by the structure of the proboscis, which is adapted for biting and blood sucking. Several species have become major pests of domestic livestock. In spite of the importance of the Stomoxyini, no exhaustive work was carried out on this group except for the most recent, and indeed the only, comprehensive monograph by Zumpt (1973). He recognized 10 genera, and little has changed since this work. One particularly striking feature in his classification is the recognition of 4 of the genera as monobasic.

It is evident that a revision of the Stomoxyini is required. Our purpose is to contribute to this work by checking the taxonomic status of the genus *Stomoxys* Geoffroy and by investigating the relationships among the species, which will lead us to offer hypotheses about the geographic origin, diversification and dispersal of the genus. *Stomoxys* is the largest genus in the tribe Stomoxyini, with 18 species recognized (Zumpt, 1973). Only *S. calcitrans* is worldwide in distribution. The other species have an exclusively tropical distribution, with 12 species on the African continent, 4 on the Asian continent, and *S. sitiens* found on both continents. Here we carry out a preliminary cladistic analysis of the *Stomoxys* group based on an analysis of morphological characters. It should be pointed out here that our work is intended as an introductory contribution to the phylogeny of this lineage.

Material and Methods

Material

The material used in this study belongs to the Laboratoire de Zoogéographie, Université Paul-Valéry, Montpellier, France, and to the Department of Entomology, the Natural History Museum, London. Only adult morphological characters were used in the analysis. For many species larval stages are not known.

Characters were coded as binary and multistate. Information not available was coded as a question mark (?).

Terminal taxa are represented by: *S. calcitrans* (Linnaeus), *S. sitiens* Rondani, *S. indicus* Picard, *S. bengalensis* Picard, *S. niger niger* Macquart, *S. niger bilineatus* Grünberg, *S. pallidus* Roubaud, *S. omega* Newstead, *S. transvittatus* Villeneuve, *S. inornatus* Grünberg, *S. varipes* Bezzi. Four outgroup taxa representing *Stomoxysiini* genus were included in the analyses: *Prostomoxys* Zumpt, *Haematobia* Lepeletier & Serville, *Haematobosca* Bezzi and *Rhinomusca* Malloch, with each genus represented by one species.

Phylogenetic analyses

The data matrix (table 1) was analyzed with two different phylogenetic inference programs using Parsimony: PAUP4.0b10 (Swofford, 2002) and TNT 1.1 (Tree Analysis using new Technology, Goloboff *et al.*, 2008). The heuristic search procedure in PAUP4.0b10 (Swofford, 2002) was performed with 1000 replicates of random addition sequence followed by TBR (tree bisection and reconnection) branch swapping. All characters were considered unweighted and non additive (all changes are considered equally informative (Goloboff, 1997)). Consensus tree were calculated as strict consensus. Cladogram measures such as the consistency index (CI), the retention index (RI) and the rescaled consistency index (RC) to evaluate the fit of the data to the cladogram.

Parsimony analyses with TNT 1.1 were performed, after increasing the maximum number of saved trees to 3.000. A traditional TBR heuristic search was implemented, performing 1000 replicates and saving 10 trees per replication, replacing existing trees. To assess confidence in the resulting phylogenetic estimate, the data were subjected to a bootstrap analysis using symmetric resampling implementing a traditional search with 33% change probability (1000 replicates). Analyses were carried out either using equal weight or weight predefined by the user.

The Weighting of characters is designed to provide a weight more important to characters that we judge carrying phylogenetic meaningful information. Weights can be assigned a priori according to morphological observations. The greatest weight was given to character predefined by Zumpt key and separating *Stomoxysiini* genera. The lowest weight was settled to morphological characters less useful for separating *Stomoxys* species.

Characters weight values settled in this study vary from 1 to 4 according to their taxonomic implication in the following way:

- Value 4, fixed to characters separating Stomoxyini genera according to Zumpt key.
- Value 3, fixed to characters separating *Stomoxys* species for both male and female according to Zumpt key.
- Value 2, fixed to characters describing *Stomoxys* species, according to Zumpt description and to personal observations.
- Value 1, fixed to the slightest variable characters within the *Stomoxys* species.

Cladograms were rooted by choosing one effective outgroup, here *Rhinomusca dutoiti*.

Characters and characters states

Rhinomusca is regarded as the most primitive genus in the Stomoxyini (Zumpt, 1973); and 27 characters were polarized by *Rhinomusca dutoiti* Zumpt as outgroup.

1- Width of female frons to eye-length: (0) about 1/2 of eye length; (1) less than 1/2. Weight: 2. (Fig. 2).

2- Width of male frons to eye-length: (0) less than 1/3; (1) more than 1/3. Weight: 2.

A narrow male frons is considered to be plesiomorphic in Stomoxyini.

3- Maxillary palpi form: (0) strap-like and internally not grooved; (1) strap-like or terminally dilated, internally grooved. Weight: 4.

Strap-like and internally not grooved palpi are considered to be plesiomorphic in the Stomoxyini by Zumpt (1973).

4- Maxillary palpi/proboscis: (0) palpi about as long as proboscis. (1) palpi much shorter than proboscis. Weight: 4. (Fig. 1).

The plesiomorphic state in the Stomoxyini is a short proboscis with palpi as long as proboscis.

5- Maxillary palpi/epistome: (0) palpi shorter than epistome; (1) palpi as long as epistome. Weight: 4. (Fig. 2).

6- Arista: (0) with dorsal and ventral hairs; (1) with dorsal hairs only. Weight: 4. (Fig. 3).

Arista with dorsal and ventral hairs is considered to be plesiomorphic (Zumpt 1973).

7- Antenna: (0) postpedicel twice as long as pedicel; (1) postpedicel 2.5 - 3 times as long as pedicel. Weight: 1. (Fig. 3).

8- Antenna colour: (0) black to dark brown; (1) yellow-brown to brown; (2) yellow to orange. Weight: 1.

9- Postalar declivity: (0) bare; (1) setulose. Weight: 4. (Fig. 4).

A setulose postalar declivity was considered to be plesiomorphic by Zumpt (1973) but we consider it to be apomorphic as it is a character that is only rarely found in the Muscidae.

10- Katepimeron ou Sternopleuron: (0) with anterior seta present; (1) with anterior seta absent. Weight: 4. (Fig. 4).

The presence of the anterior katepisternal seta is plesiomorphic (Zumpt, 1973).

11- Colour of scutum: (0) greyish pruinose; (1) shining undusted. Weight: 1.

12- Notopleuron ou propleuron: (0) setulose; (1) bare. Weight: 4. (Fig. 4).

The presence of setulae around the base of the setae is plesiomorphic (Zumpt, 1973).

13- Proepisternal declivity: (0) bare; (1) setulose or bare; (2) setulose. Weight: 4. (Figure 4).

The presence of setulae in the proepisternal declivity is said to be plesiomorphic by Zumpt (1973), but we consider it to be apomorphic as it is a character that is only rarely found in the Muscidae, but most notably in *Musca domestica* Linnaeus.

14- Scutal pattern: (0) type I; (1) type II; (2) type III. Weight: 1. (Fig. 5).

15- Wings of male: (0) hyaline; (1) with a slight or complete brownish tinge. Weight: 2.

16- Vein R1 (1st longitudinal wing vein), at base on dorsal surface: (0) bare; (1) with a few setulae. Weight: 3. (Fig. 6).

17- Vein R1 (1st longitudinal wing vein), on terminal part: (0) bare; (1) with few a setulae. Weight: 1.

18- Vein R4+5 (3rd longitudinal vein), on dorsal surface: (0) setulose up to, or rarely slightly past, r-m crossvein; (1) setulose almost on entire length; (2) bare. Weight: 1. (Fig. 6).

19- Cell r4+5 (1st posterior wing cell), opening at wing-margin: (0) less than 1/2 as wide as cell width at widest point; (1) one half as wide as cell width at widest point. Weight: 3. (Fig. 6).

- 20- Colour of femora: (0) black to dark brown; (1) yellow to yellow brown; (2) only 2/3 proximal yellow. Weight: 1.
- 21- Colour of tibiae: (0) dark brown to blackish; (1) yellow to yellow-brown. Weight: 2.
- 22- Colour of tarsi: (0) dark brown to blackish; (1) yellow to yellow-brown. Weight: 3.
- 23- Hind femur: (0) with a row of few hairs ventrally; (1) with long ventral hairs, some of which are longer than the femoral diameter; Weight: 2.
- 24- Hind tibia: (0) without submedian ventral setae; (1) with 2 or 3 short ventral setae in apical half. Weight: 2.
- 25- Protarsus in male: (0) simple; (1) with a row of curled hairs. Weight: 2.
- 26- Tarsomere 1 of hind leg in male: (0) simple; (1) enlarged. Weight: 2.
- 27- Ground-colour of abdomen: (0) blackish or dark brown; (1) yellow to yellow-brown. Weight: 3.

Results and discussion

Analysis of all characters with equal weight produced 8 most parsimonious cladograms with PAUP (length = 62 steps; CI = 0.52; RI = 0.36; RC = 0.19; the CI excluding uninformative characters was 0.43) and 5 cladograms with TNT. Both analyses produce the same strict consensus cladogram (Fig. 7). Resulting cladogram was unresolved. *Stomoxys* species appear as sister group of *Haematobosca wooffi* and *Haematobia irritans* clade. *Haematobosca* and *Haematobia* genera seem cluster (bootstrap = 77 for both analyses). Most of *Stomoxys* species are presented in polytomic nodes and that does not inform us about their phylogenetic relationship. However, we note the existence of a clade “A” including *S. inornatus*, *S. transvittatus*, *S. pallidus* and *S. omega*. This cluster was supported by high bootstrap values (84 and 66 for TNT and PAUP respectively).

Application of character weighting provided an improvement in resolution of the cladogram by tying *S. niger niger*, *S. niger bilineatus* and *S. varipes* together as sister group for *S. indicus*, *S. bengalensis*, *S. calcitrans* and *S. sitiens* (Fig.8).

According to Goloboff (1997), weighting method should be able to recover the “right” groupings, since it shows more nodes than equal weighting in the tree. Our results show greater number of nodes for weighted optimization (5 and 11 nodes with equal weighting and weighting methods respectively) (Fig. 7, 8).

The tree produced by TNT using weight predefined by user is selected to list major synapomorphies (Fig. 9). Hence, species of *Stomoxys* appear as the sister group of the clade comprising *H. wooffi* and *H. irritans*. Monophyly of *Stomoxys* species is supported by palpi much shorter than proboscis (character 4). *Stomoxys* is characterized by palps shorter than half the length of the proboscis. Zumpt mentioned that the plesiomorphic form of the Stomoxyini mouth-parts can be accepted as the maxillary palps being about as long as the proboscis.

Phylogenetic analysis split the *Stomoxys* group into three major monophyletic groups: Clade A (described previously); clade “B” including *S. niger* and *S. varipes* and clade “C” including *S. indicus*, *S. bengalensis*, *S. sitiens* and *S. calcitrans*.

-Clade “A” is supported by one synapomorphy, hind tibia with 2 or 3 short ventral setae in apical half (character 24). This clade includes species from different parts of Ethiopian region. These species are ubiquitous and are restricted to forest landscapes, where they feed especially on wildlife fauna (Zumpt, 1973).

- Clade B is supported by one synapomorphy (character 5): the maxillary palpi being as long as epistome. This character was diagnosed by Garros *et al.* (2004) when comparing *S. niger niger* and *S. calcitrans* in La Reunion island. Moreover, we have observed this character for *S. n. bilineatus* and the few females of *S. varipes* we could observe.

The close relations between *S. niger niger*, *S. niger bilineatus* and *S. varipes*, corroborated in this analysis, were discussed by Zumpt (1973) who treated *S. niger niger* and *S. niger bilineatus* as two “subspecies”. Colour of tibiae and tarsi (character 21 and 22) was different in both species, blackish for *S. niger niger* and yellow to yellow-brown for *S. niger bilineatus*. But differences in colour may be influenced by different development stage conditions. According to Zumpt (1973) description, male *S. varipes* morphology is very close to *S. niger*. In Malloch’s key (1932a) *S. varipes* male runs down to *S. niger*. *S. varipes* males were separable from *S. niger* only by longer and denser hairs on mesonotum (Zumpt, 1973). However, nothing was recorded about the biology of *S. varipes*. For *S. niger* subspecies, some information about their ecological habits were collected in Gabon. *S. niger bilineatus* is abundant in savannas with wild fauna, whereas *S. niger niger* is more linked to human activities (Mavoungou *et al.*, 2008).

-The monophyly of Clade C was defined by the presence of few setulae at the base of the 1st longitudinal wing vein. After *S. calcitrans*, *S. indicus* is the most common *Stomoxys* species

in the Oriental region. *S. indicus* is associated to cattle and seem to be active in the evening, whereas, remaining species are diurnal (Mavoungou *et al.*, 2008, Masmehatip *et al.*, 2006). *S. bengalensis* occurs only in Asia, *S. sitiens* is found in both African and Asian continents while *S. calcitrans* has a widespread distribution. *S. calcitrans* and *S. sitiens* have been found associated with human activities. *S. calcitrans* is characterized by 2 autapomorphies (character 1 and 2), both male and female present broader frons width.

Conclusion

We have presented here an initial step for *Stomoxys* cladistic analysis. But we were limited in this analysis by the low number of characters available. Colour characters can be a bit dubious because they are easy changed, e.g. temperature in the puparial stage (Wilson *et al.*, 1992). There are indeed very few structural characters to differentiate *Stomoxys* species. Our study manages to clarify many important issues surrounding the systematics of *Stomoxys* genus. It also provides a first insight into the relationships within the Stomoxyini and is a start for more extensive work on this tribe involving the remaining Stomoxyini genera. Dissection of male genitalia could provide a good taxonomic feature by describing the cerci and the surstyli shape. Indeed, immature stages and ecological information must be taken into account. It is clear, that combined morphological, ecological and molecular information is needed to resolve *Stomoxys* relationships

We are confident that the ongoing work on the Assembling the Tree of Life for Diptera will soon provide new data about natural history evolution in Diptera and other insects.

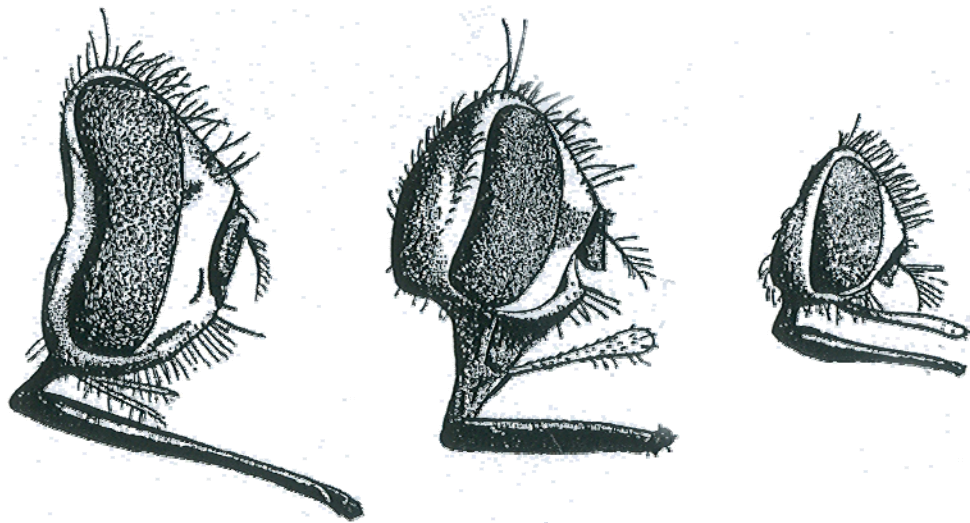


Fig. 1: Heads of *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus), *Haematobosca stimulans* (Meigen) and *Haematobia irritans* (Linnaeus). Source: Zumpt (1973).

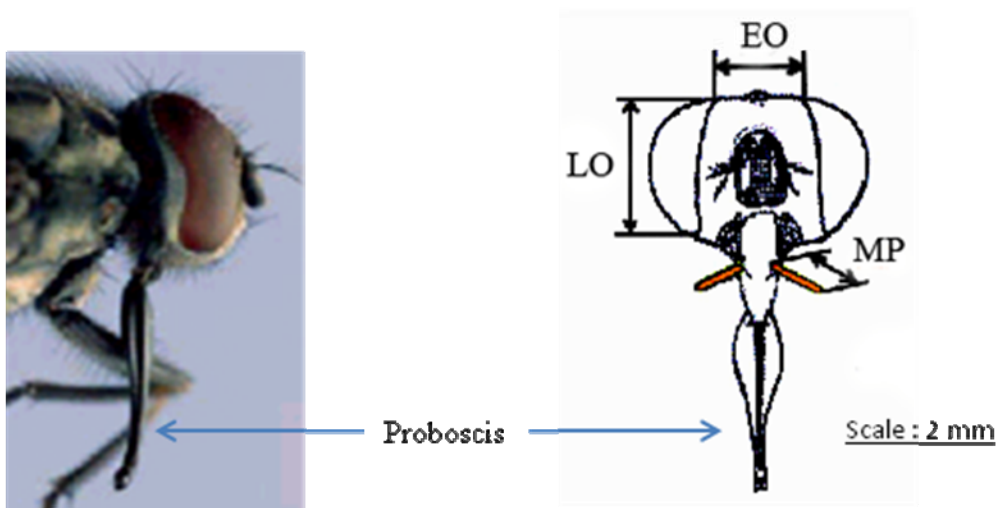


Fig. 2: Head of *Stomoxys calcitrans*. EO: interocular distance; LO: ocular length; PM: length of maxillary palpus.

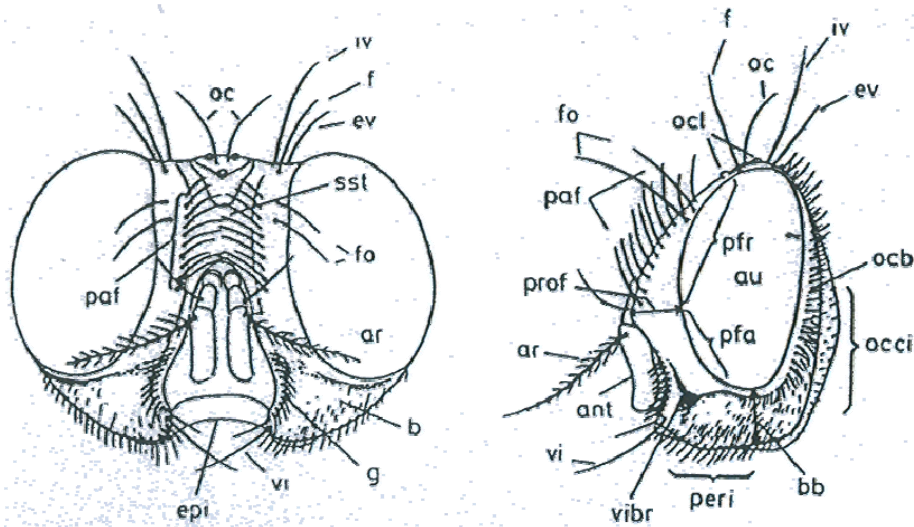


Fig. 3: Frontal and lateral view of head of a musciform fly.

ant = antenna, ar = arista, au = compound eye, b = bucca, bb = height of bucca, epi = epistome, ev = outer vertical bristle, f = frontal bristle, fo = fronto-orbital bristles, g = facial ridge, iv = inner vertical bristle, oc = ocellar bristle, ocb = postocular bristles, occi = occiput, ocl = ocelli, paf = parafacial bristles, peri = peristome, pfa = parafacialium, pfr = parafacialium, prof = profrons, sst = frontal stripe, vi = vibrissa, vibr = vibrissarium.
Source: Zumpt (1973).

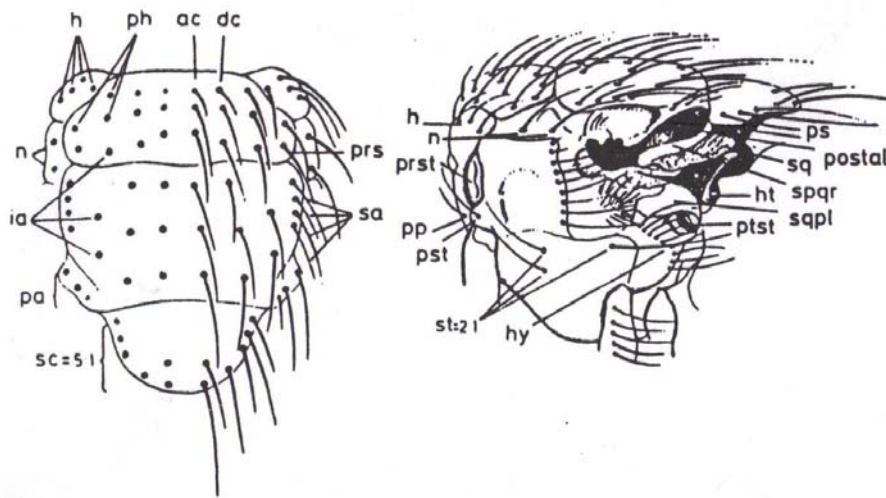


Fig. 4: Thorax, dorsal and lateral view of Diptera;

Ac = acrostichal bristles, dc = dorsocentral bristles, h = humeral bristles, ht = halter, hy = hypopleuron with hypopleural bristles, ia = intra-alar bristles, n = notopleural bristles, pa = postalar bristles, ph = posthumeral bristles, postal = postalar declivity, pp = propleural bristles, prs = presutural bristles, prst = prostigma, ps = postscutellum, pst = prostigmatic bristle, ptst = poststigmata, sa = supra-alar bristles, sc = scutellar bristles, spqr = suprasquamal ridge, sq = thoracic squama, sqpl = supraspiracular convexity, ststernopleuron with bristles. Source: Zumpt (1973).

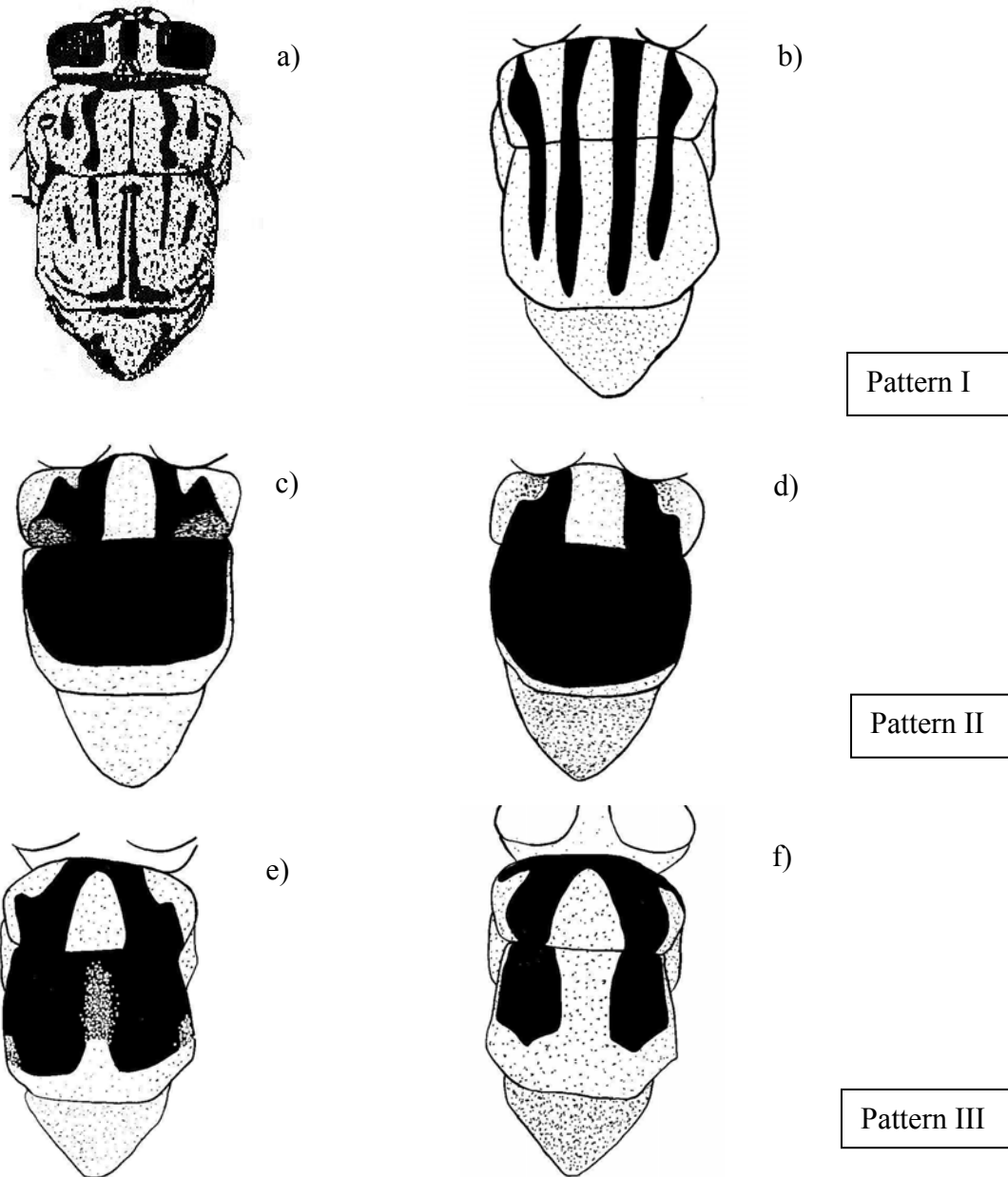


Fig. 5: Different thoracic patterns of *Stomoxys* species.

- Pattern I: drawn from a) *R. dutoiti* and b) *S. calcitrans*. Similar pattern was observed by *S. sitiens*, *S. indicus*, *S. bengalensis*, *S. niger niger*, *S. niger bilineatus*, *S. varipes*, *H. woffi*, *H. irritans* and *P. saegerae*;

- Pattern II: drawn from c) *S. omega* and d) *S. pallidus*;

- Pattern III: drawn from e) *S. inornatus* and f) *S. transvittatus*.

Source: Najla Dsouli-Aymes.

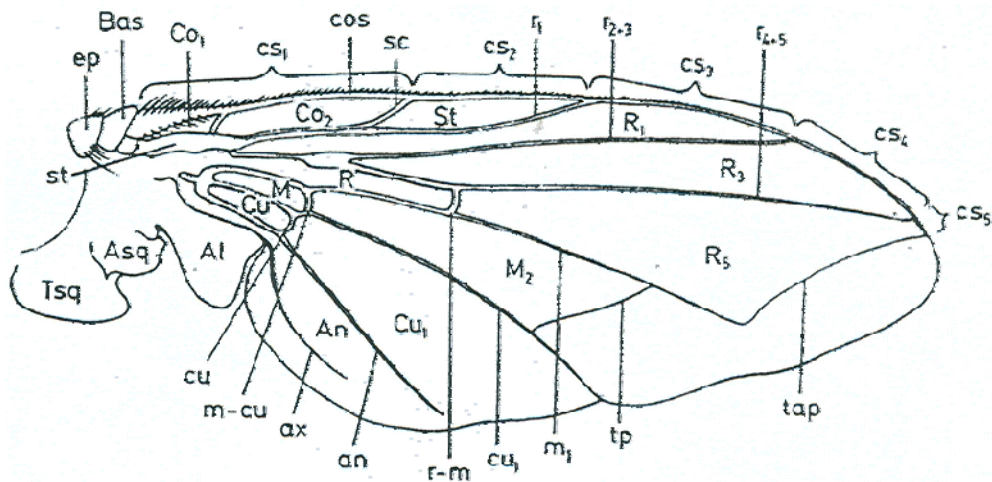


Fig. 6: Wing of a musciform fly.

ep = epaulet, Bas = basicosta, Co₁ = costal cell, St = subcostal cell, R = first basal cell, R₁ = marginal cell, R₃ = submarginal cell, R₅ = first posterior cell, M = second basal cell, M₂ = second posterior or discal cell, Cu = third basal cell, Cu₁ = third posterior cell, An = axillary cell, Al = aluta, Asq = alar squama, Tsq = thoracic squama, cos = costa, CS₁₋₅ = segments of costa, st = stem vein, sc = subcosta, r₁ = first longitudinal vein, r₂₊₃ = second longitudinal vein, r₄₊₅ = third longitudinal vein, m₁ = fourth longitudinal vein (media), cu₁ = fifth longitudinal vein, an = sixth longitudinal vein, ax = axillary vein, r-m = discal cross vein, m-cu = upper cross vein, cu = lower basal cross vein, tap = upper marginal cross vein, tp = lower marginal cross vein. Source: Zumpt (1973).

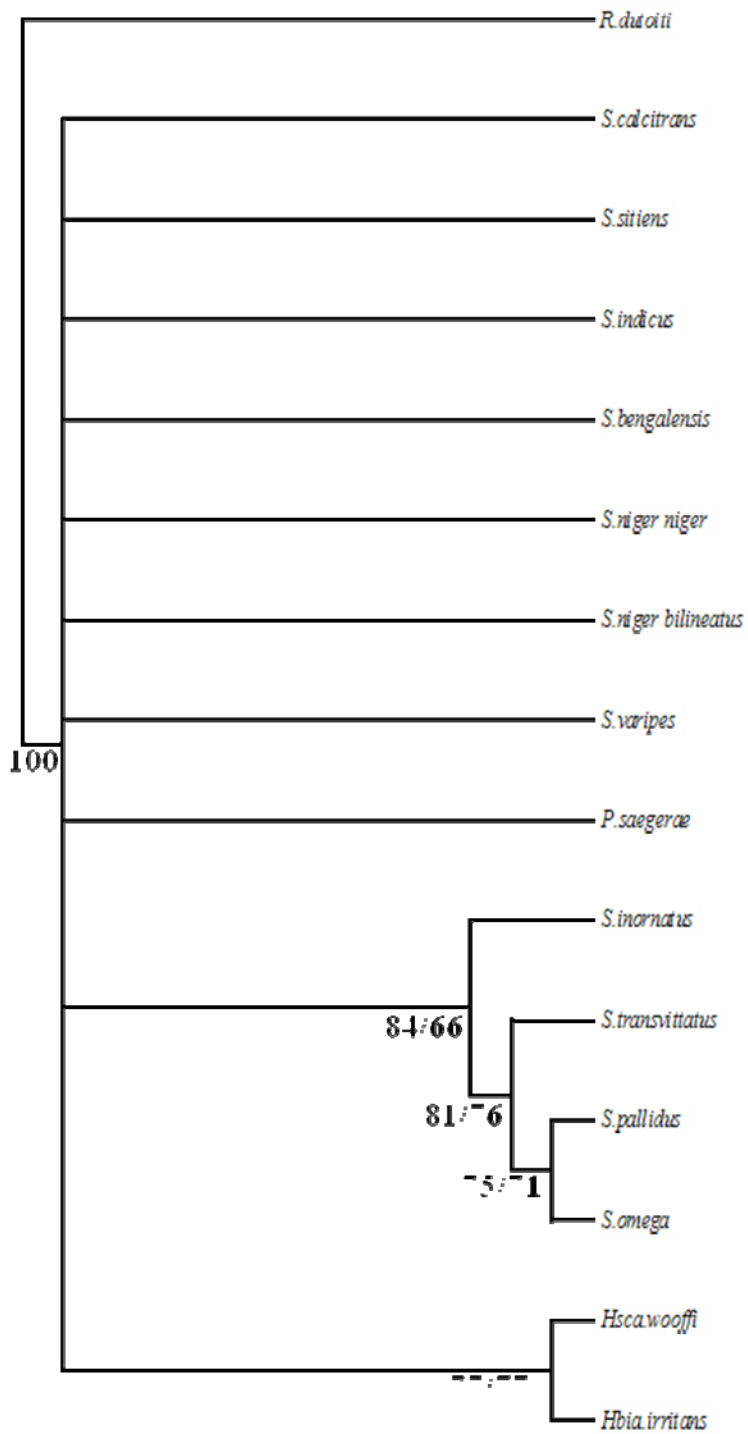


Fig. 7: Strict consensus of the most parsimonious cladograms under Equal Weight, generated by PAUP and TNT.

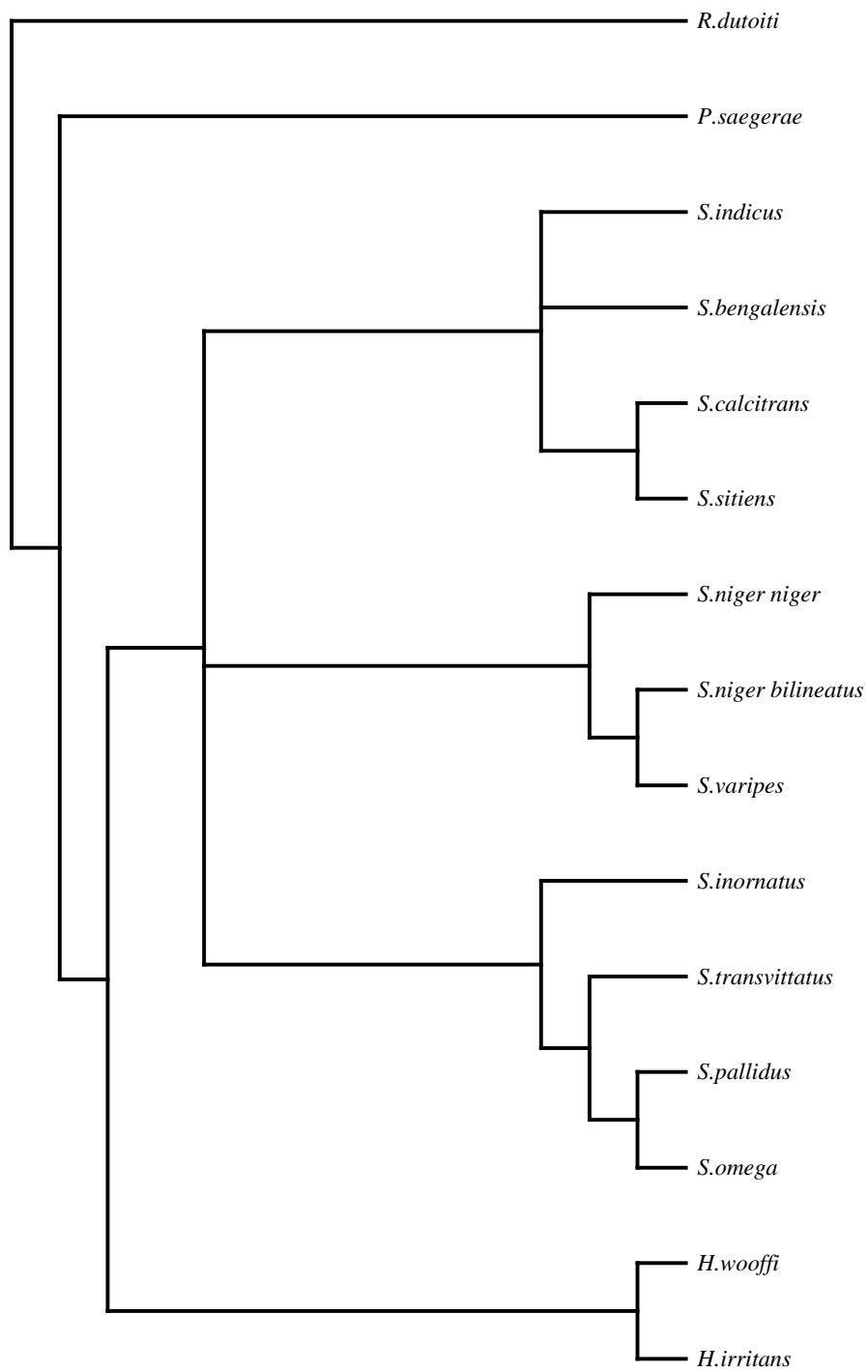


Fig. 8: Strict Consensus cladogram (11 nodes), with weighted characters produced by TNT.

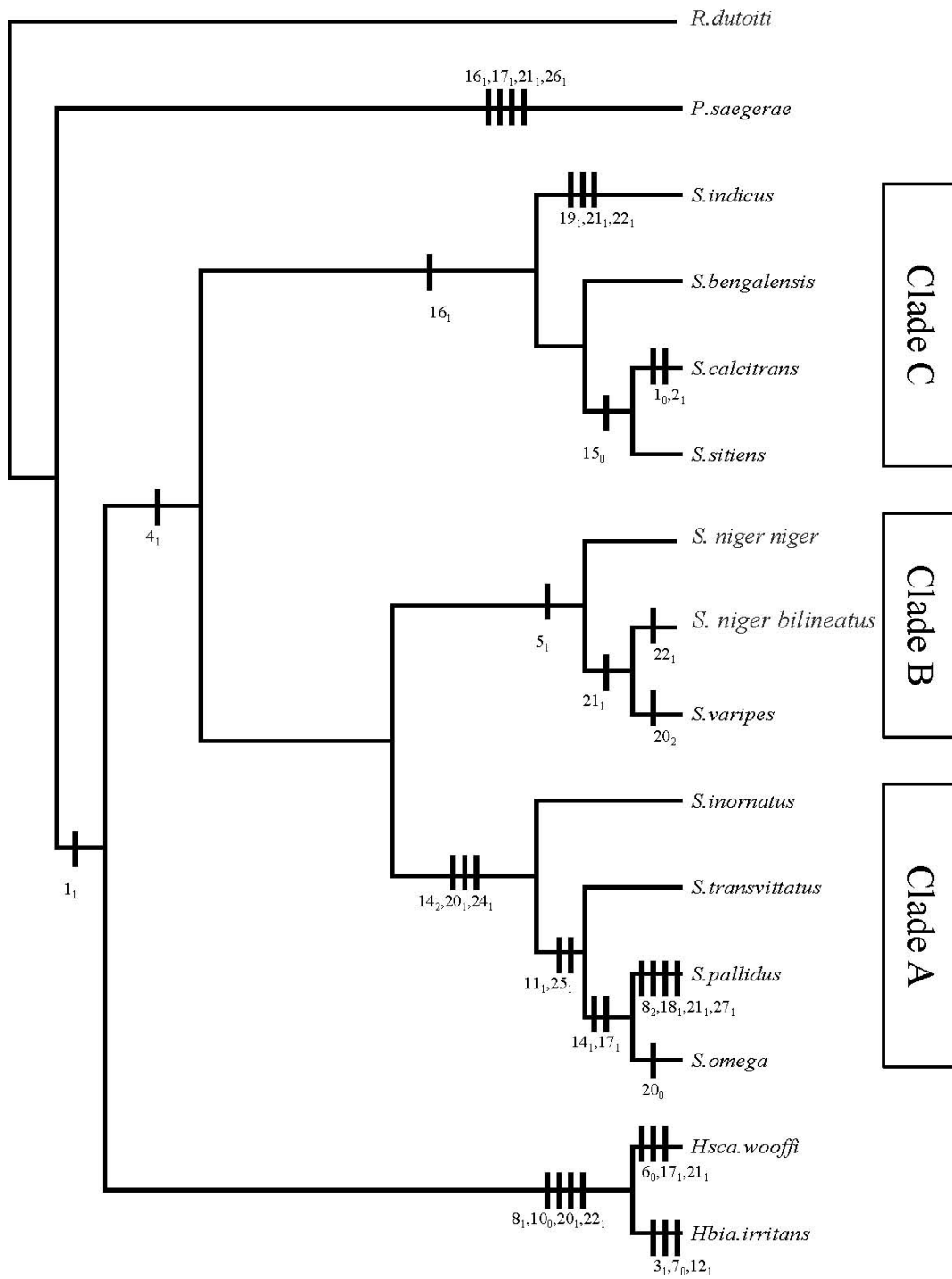


Fig. 9: Strict Consensus cladogram, with weighted characters produced by TNT, showing character distribution.

Table 1: Data matrix of some *Stomoxyni* species used in the cladistic analysis

	1														2													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	
<i>Stomoxys calcitrans</i>	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Stomoxys sitiens</i>	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Stomoxys indicus</i>	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	2	0	1	1	0	0	1	0	1	1	?	0	0	0	0	
<i>Stomoxys bengalensis</i>	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
<i>Stomoxys niger</i>	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
<i>Stomoxys bilineatus</i>	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	
<i>Stomoxys pallidus</i>	1	0	0	1	0	1	1	2	0	1	1	0	2	1	1	0	1	1	0	1	1	0	?	1	1	0	1	
<i>Stomoxys omega</i>	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
<i>Stomoxys transvittatus</i>	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	2	2	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
<i>Stomoxys inornatus</i>	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	2	2	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
<i>Stomoxys varipes</i>	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	2	1	0	1	0	0	0	0
<i>Haematobosca wooffi</i>	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	?	1	1	1	0	0	0	0	0	
<i>Haematobia irritans</i>	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	2	?	1	0	1	0	0	0	0	0	
<i>Prostomoxys saegerae</i>	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	2	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	?	0	1	0	
<i>Rhinomusca dutoiti</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

References

- De Carvalho, C.J.B. (1989a) Revisão das espécies e posição sistemática de *Palpibracus* Rondani (Diptera, Muscidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, **6**, 325–375
- De Carvalho, C.J.B. (1989b) Classificação de Muscidae (Diptera): una proposta através da análise cladística. *Revista Brasileira de Zoologia*, **6**, 627–648.
- De Carvalho, C.J.B & Couri, M.S. (2002) Part I. Basal groups. In: de Carvalho C.B.J., ed. Muscidae (dipteral) of the neotropical region: Taxonomy. *Curitiba: Editoria Universidade Federal do Paraná*, 17-132.
- Couri, M.S. & Pont, A.C. (2000) Cladistic analysis of Coenosini (Diptera: Muscidae: Coenosinae). *Systematic Entomology*, **25**, 373-392.
- Couri, M.S. & De Carvalho, C.J.B. (2003) Systematic relations among *Philornis* Meinert, *Passeromyia* Rodhain & Villeneuve and allied genera (Diptera, Muscidae). *Brazilian Journal of Biology*, **63**, 223–232.
- Garros, C, Gilles, J. & Duvallet, G. (2004) Un nouveau caractère morphologique pour distinguer *Stomoxys calcitrans* et *S. niger* (Diptera: Muscidae). Comparaison de populations de l'île de la Réunion. *Parasite*, **11**, 329-332.
- Goloboff, P.A. (1997) Self-Weighted Optimization: Tree searches and character state reconstructions under implied transformation costs. *Cladistics*, **13**, 225-245.
- Goloboff, P.A, Farris, J.S. & Nixon, K.C. (2008) TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*, **24**, 774-786.
- Hennig, W. (1965) Vorarbeiten zu einem phylogenetischen System der Muscidae (Diptera: Cyclorrhapha). *Stuttgarter Beiträge Zur Naturkunde*, **141**, 1–100.
- Kutty, S.N., Pape, T., Pont, A., Weigmann, B.M. & Meier R. (2008) The Muscoidea (Diptera: Calyptratae) are paraphyletic: Evidence from four mitochondrial and four nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **49** (2), 639-652.
- Malloch, J. R. (1932a) Exotic Muscaridae (Diptera). - XXXVI. [Part.] *Annals and Magazine of Natural History*, **10**, 9, 377-405.
- Malloch, J. R. (1932b) Exotic Muscaridae (Diptera). - XXXVI. [Part.] *Annals and Magazine of Natural History*, **10**, 9, 421-447.

- Malloch, J. R. (1932c) Exotic Muscaridae (Diptera). - XXXVI. *Annals and Magazine of Natural History*, **10**, 9, 501-518.
- Malloch, J. R. (1934) Muscidae. In: *Diptera of Patagonia and South Chile*, London, **7** (2), 171-346.
- Masmeatathip, R., Gilles, J., Ketavan, C. & Duvallet, G. (2006) First survey of seasonal abundance and daily activity of *Stomoxys spp.* (Diptera: Muscidae) in Kamphaengsaen campus, Nakornpathom Province Thailand. *Parasite*, **13**, 245-250.
- Mavoungou, J.F., Jay-Robert P., Gilles J., Atsame E.A. & Duvallet, G. (2008) Ecologie des stomoxes (Diptera : Muscidae) au Gabon. i – Premier inventaire dans différentes zones écologiques. *Parasite*, **15**, 27-34.
- Nihei, S.S. & De Carvalho, C.J.B. (2007) Phylogeny and classification of Muscini (Diptera, Muscidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, **149**, 493–532.
- Savage, J. & Wheeler, T.A. (2004) Phylogeny of the Azeliini (Diptera: Muscidae). *Studia Dipterologica*, **11**, 259-299.
- Savage, J., Wheeler, T.A. & Wiegmann, B.M. (2004) Phylogenetic analysis of the genus *Thricops* Rondani (Diptera: Muscidae) based on molecular and morphological characters. *Systematic Entomology*, **29**: 395-414.
- Séguy, E. (1937) Diptera, Fam. Muscidae. – Genera Insect, **205**, 604pp.
- Schuehli, G.S. & De Carvalho, C.J.B. (2005) Revision and cladistics of the Neotropical genus *Pseudoptilolepis* Snyder (Diptera, Muscidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, **22**, 23–34.
- Swofford, D.L. (2002) PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). *Sinauer Associates, Sunderland MA*.
- Wilson, M.D., Post, J. & Boakyle D.A. (1992) Studies on environmentally-induced colour variation in *Similium sirbanum* (Diptera: Simuliidae) using a portable rearing system. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **86** (2): 169-174.
- Zumpt, F. (1938) 1. Vorstudie zu einer monographischen Bearbeitung der Stomoxydinae. Taxonomische Ergebnisse des Studiums einiger Sammlungen, besonders der von Bezzi und Enderlein. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, **25** (2), 337-353.

Zumpt, F. (1939) Das System der Stomoxydinae. Ein Beitrag zu schwebenden Fragen der Taxonomie. 2. Vorstudie zu einer monographischen Bearbeitung der Stomoxydinae. *Proceedings of the 7th International Congress for Entomology, Berlin*, **3**: 1723-1733.

Zumpt, F. (1940) Vorstudie zu einer monographischen Bearbeitung der Stomoxydinae. Über einige afrikanische und orientalische *Stomoxys*-Arten. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, **27** (1), 126-141.

Zumpt, F. (1950) 5th preliminary study to a monograph of the Stomoxydinae. Key to the Stomoxydinae of the Ethiopian region, with description of a new *Haematobia* and a new *Rhinomusca* species from Zululand. *Anais do Instituto de Higiene e Medicina Tropical*, **7**, 397-426.

Zumpt, F. (1973) The Stomoxyine Biting Flies of the World. Diptera: Muscidae. Taxonomy, biology, economic importance and control measures. Fischer, Stuttgart, viii + 175 pp.

Article 1

Combined mitochondrial and nuclear phylogenetic analyses support the paraphyly of the genus *Stomoxys* (Diptera: Muscidae) and suggest an Oriental origin of these parasitic flies

(Soumis à *Systematic Entomology*)

Combined mitochondrial and nuclear phylogenetic analyses support the paraphyly of the genus *Stomoxys* (Diptera: Muscidae) and suggest an Oriental origin of these parasitic flies

N. DSOU LI-AYMES¹, F. DELSUC², J. MICHAUX³, E. DE STORDEUR¹, A. COULOUX⁴, M. VEUILLE⁵ and G. DUVALLET¹

¹ Centre d'Ecologie fonctionnelle et évolutive UMR 5175 CEFE, Université Montpellier 3, Montpellier, France.

² Laboratoire de Paléontologie, Phylogénie et Paléobiologie, Université Montpellier 2, Montpellier, France.

³ Centre de Biologie et de Gestion des Populations, Montpellier, France

⁴ Centre National de Séquençage, Evry cedex, France

⁵ Biologie Intégrative des Populations, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France

Correspondence: Najla Dsouli-Aymes, Centre d'Ecologie fonctionnelle et évolutive (UMR 5175 CEFE), Université Montpellier 3, Route de Mende, 34199 Montpellier Cedex 5, France.

E-mail: dsouli2005@yahoo.fr

Short title: Phylogeny of *Stomoxys* genus

Abstract

The genus *Stomoxys* Geoffroy (Diptera; Muscidae) contains species of parasitic flies that are of medical and economic importance. We conducted a phylogenetic analysis including ten representative species of the genus, together with the closely related genera *Prostomoxys* Zumpt, *Haematobosca* Bezzi, and *Haematobia* Lepeletier & Serville. Phylogenetic relationships were inferred using Maximum Likelihood and Bayesian methods from DNA fragments from the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI, 753 bp), the cytochrome b gene (CytB, 587 bp) genes, and the nuclear ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2, 426 bp). The combination of mitochondrial and nuclear data strongly supports the paraphyly of the genus *Stomoxys* because of the inclusion of *Prostomoxys saegerae* (Zumpt). This unexpected result suggests that *Protostomoxys* should be renamed into *Stomoxys*. Also, the deep molecular divergence observed between the subspecies *S. niger niger* Macquart and *S. niger bilineatus* Grünberg led us to propose that they should be considered as distinct species in agreement with ecological data. Moreover, our phylogenetic results revealed three distinct lineages within the genus *Stomoxys* with a strong biogeographical component. The first and most basal lineage is represented by the sole and divergent Asian species *S. indicus*. The second clade consist of the strictly African species *S. inornatus*, *S. transvittatus*, *S. omega*, and *S. pallidus*. Finally, the third clade includes both African occurring and more widespread species such as the livestock pest *S. calcitrans*. Both, the inferred topology and divergence time estimates suggest that the genus *Stomoxys* originated in the Oriental region in the late Oligocene around 30 million years ago with subsequent migration events between the African and Asian continents.

Introduction

Stomoxys flies belong to the tribe Stomoxyini in the subfamily Muscinae (De Carvalho, 1989; Couri & De Carvalho, 2003). This subfamily is part of the large family Muscidae comprising about 4500 described species in 180 genera (De Carvalho *et al.*, 2005). Within Muscidae, several taxonomic levels have been studied using phylogenetic criteria to assess relationships among species (Couri & De Carvalho 2003; Schuehli & De Carvalho 2005; De Carvalho & Pont 2006; Couri & Pont 2000).

Recently, Nihei & De Carvalho (2007) carried out a cladistic analysis to assess the monophyly of the Muscini tribe. However, since the monograph of Zumpt (1973) who proposed the monophyly of Stomoxyini on the basis of morphological characters, and despite the medical and economic importance of Stomoxyini, no phylogenetic analysis has been carried out to assess their taxonomic position. The flies of the Stomoxyini tribe are recognized easily by their piercing/sucking mouthparts (which differentiate them from the common housefly (*Musca domestica*)). The Stomoxyini consist of 10 genera and about 39 species reviewed by Zumpt, the most medically and economically important being *Haematobosca* Bezzi, *Haematobia* Lepeletier & Serville and *Stomoxys* Geoffroy.

Stomoxys flies are principally haematophagous, and are associated with livestock and wildlife throughout the world. The most studied species, *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus), is an economically important pest of cattle and several studies have attempted to estimate their impact on cattle production (Miller *et al.*, 1973; Campbell *et al.*, 1977, 2001). They represent a serious nuisance not only because of their painful bites and blood predation, but also because they are involved in the mechanical transmission of several pathogens (Zumpt, 1973; D'Amico *et al.*, 1996; Foil & Gorham, 2000).

The genus *Stomoxys*, which originated from the Old World, includes 18 species (Zumpt, 1973). Only *S. calcitrans* has a worldwide distribution, as it is a synanthropic fly. Other species are exclusively tropical, twelve of which are located on the African continent, four on the Asiatic continent and one species, *S. sitiens* Rondani, has been found in both African and Asiatic continents (Zumpt, 1973) (Table 1).

In this study, First, we clarify the phylogenetic relationships of the *Stomoxys* genus mitochondrial (COI, Cyt-b) and ribosomal (ITS2) nucleotide sequences. Mitochondrial DNA (mtDNA) was chosen because of its maternal inheritance, high copy number, and availability of many universal PCR primers. The ITS2 regions are easy to amplify and are used already in other phylogenetic studies of Muscidae (Avisé, 2004). This work explores congruence and information content within the different molecular datasets analysed using multiple phylogenetic methods. Phylogenetic results partitions are discussed and taken in consideration to make a revision of the group. Second, we propose estimations of divergence times of major clades. Then, we attempt to discuss the evolutionary history of *Stomoxys* species.

Materials and Methods

Taxon sampling

The material used in this study belongs to the Laboratoire de Zoogéographie, Université Paul-Valéry, Montpellier, France, and to the Department of Entomology, the Natural History Museum, London. For *Stomoxys* we included 12 species or subspecies. As outgroups, we incorporated *Prostomoxys saegerae*, the unique representative species of *Prostomoxys*, and *Haematobosca croceicornis* Pont and Dsouli, a new species described from Gabon (Pont & Dsouli, *in press*). For this study we included sequences of *Haematobia irritans* (Linnaeus) and *Musca domestica* obtained from GenBank. Geographical origins of studied specimens are listed in Table 1. Voucher specimens are deposited at Laboratoire de Zoogeographie (Université Paul Valéry, Montpellier, France).

DNA extraction, amplification and sequencing

Genomic DNA was extracted using the DNeasy tissue Kit (QIAGEN) to a final volume of 180 µl. Amplification by PCR, using the primer pairs described in Table 3, revealed amplicons for the COI (753 bp), CytB (587 bp) and ITS2 (~ 430 bp) regions. Standard protocols were used for all PCR amplifications. They were performed in a 30µl reaction volume containing, in final concentrations, 200 µM dNTPs (diNucleotide Tri Phosphate), 10 x buffers, 25µM of each primers and 0.5µl Taq polymerase (Eurogentec Red GoldStar[®]), and 3 µl of 180µl total volume of DNA solution extraction. Thermal cycling conditions were initial denaturation at 94°C for 4 min, 35 cycles of denaturation at 94°C for 40 s, annealing at 48-50°C for COI, 57-58°C for Cyt-b, and 60-62°C for ITS2, and extension at 72°C for 1 min.

An elongation step at 72°C for 10 min completed the DNA amplification. One to ten specimens for each species were sequenced at the CNS Genoscope, Evry, France.

Phylogenetic analysis

The nucleotide sequences from COI, Cyt-b and ITS2 were aligned using the multiple alignment program ClustalW 1.4 (Thompson *et al.*, 1994) implemented in BioEdit (Hall, 1999). Sequence alignment was adjusted by visual inspection, taking the sequence of *S. calcitrans* available in GenBank as a reference (Table 2). Alignments were cleaned from problematic alignment blocks using Gblocks 0.91 (Castresana, 2000).

Analyses were carried out on various datasets, including COI, Cyt-b, ITS2 and combined mtDNA - rDNA. Sequences for the ITS2 gene region could not be obtained for *S. sitiens* from Burkina and for *S. uruma* Shinonaga & Kano. Incongruence in combined markers was tested using the incongruence length difference test (ILD test) (Farris *et al.*, 1994) within PAUP4.0b10 (Swofford, 2002).

Maximum likelihood (ML) reconstruction was conducted within PHYML v2.1b1 (Guindon & Gascuel, 2003). The optimal model of molecular evolution for likelihood analysis was chosen using AIC as implemented in Modeltest (Posada & Crandall, 1998) using PAUP4.0b10 (Swofford, 2002). ML trees were bootstrapped with 1000 replicates to evaluate the confidence for each node of the tree topology; the branches with less than 50 % support are generally shown as unresolved polytomies.

Bayesian Markov Chain Monte Carlo phylogenetic analysis was conducted using MrBayes 3.0 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) using the models and parameters suggested for each data matrix by Modeltest. Each Markov chain in the Bayesian search was started from a random tree and run for 3,000,000 generations. Trees were saved every 500 generations. Four chains were run simultaneously, three hot and one cold. The initial 2000 trees in each run were discarded as burn-in samples. Posterior probabilities greater than or equal to 95 % are generally regarded as strong support for a clade (Wilcox *et al.*, 2002).

Base frequencies, sequence variations, and divergence values were determined using the MEGA 4 program were conducted using the Maximum Composite Likelihood method in MEGA4 (Tamura *et al.*, 2004; 2007). Rate variation among sites was modeled for each gene with the gamma distribution value found with the best model. All positions containing gaps and missing data were eliminated from the dataset.

Molecular dating

Comparisons of gene sequence variation over time enable estimation of historical dates of divergence with or without the aid of dates provided from the fossil record. Recent approaches for estimating divergence use stochastic methods that assume a different rate of evolution and therefore explain the rate heterogeneity between lineages (Douzery *et al.*, 2006; Knapp *et al.*, 2005).

Bayesian inference under relaxed-clock models implemented by Multidivtime (Thorne & Kishino, 2002) (<http://statgen.ncsu.edu/thorne/multidivtime.html>) was used to perform the molecular dating process. An assumed topology, onto which sequence divergence rates are estimated, was sourced from a tree generated in this study (Fig. 3) as the best hypothesis of *Stomoxys* evolution. Further species of Drosophilidae (*D. virilis*, *D. melanogaster* and *D. yakuba*), Syrphidae (*Simosyrphus grandicornis*, *Cheilosia longula* and *Cheilosia naruska*) and Dolichopodidae (*Dolichopus longula* and *D. nubilus*), representing other brachyceran groups as well as nodes for which divergence dates are available, were included. The sequences were largely downloaded from Genbank. Information were taken from Wiegmann *et al.* (2003) divergence time estimate, based on bayesian analysis of the 28SrDNA data. The tree was calibrated by the occurrence of Schizophora 87 myr ago and the date of Drosophila/Musca split between 48 and 51 Mya (million years ago).

First, the program Baseml of the Paml package version 4.2b (Yang, 2007) (<http://abacus.gene.ucl.ac.uk/software/paml.html>) was used to estimate the nucleotide frequencies, transition / transversion ratio and rate heterogeneity between the sites for dataset. These values parameterize the F84 substitution model. Second, using this model we calculated the branch lengths of the constrained topology with Estbranches, a component of Multidivtime. Finally, the program Multidivtime was used to run a Markov chain Monte Carlo for estimating mean posterior divergence times on nodes with associated standard deviations from the variance–covariance matrix produced by Estbranches. The Markov chain was sampled 10,000 times every 100 cycles after a burn-in stage of 100,000 cycles. We used a 87- Mya (SD=43 Mya) prior for the expected number of time units between tip and root. Tree with estimated branch length obtained by Estbranches, was used to estimate the median amount of evolution between the root and all the tips of the ingroup. Other priors for gamma distribution of the rate at root node (rtrate and rratesd) and the Brownian motion constant describing the rate variation (brownmean and brownsd) were derived from the median branch length. Bigtime was set approximately to 119 Mya, the highest possible number of time units between tip and root. The age of node: Musca + Drosophila was constrained as upper bound = 51 and lower bound = 48.

Results

Sequence characteristics

Specimens from British museum were not sequenced, because we failed to extract DNA from dry tissues.

Alignment of the mitochondrial genes was straightforward, as no indels were found. The alignment of COI mtDNA sequences produced 753 bp in length. Of these, 525 were constant and 198 (26.3 %) were informative. Modeltest identified the GTR+ I+G model as the best model for phylogenetic analysis (lnL= -3610.24). The gamma distribution shape parameter (G) was 0.2. Alignment statistics are summarized in Table 4. Genetic distances among *Stomoxys* species ranged from 5.1 % (between *S. varipes* and *S. niger niger*) to 24 % (between *S. indicus* and *S. transvittatus*). The genetic distance between *S. niger niger* and *S. niger bilineatus* was 8.5 %, result shown in Table 5.

The 587 bp of Cyt-b sequences contained 204 variable sites (34.7 %), of which 161 (27.4 %) were informative. Modeltest has also identified the GTR+ I+G model as the best nucleotide substitution model (lnL= -3121.46). The gamma distribution shape parameter (G) was 0.258. Genetic distances among *Stomoxys* species ranged from 3.4 and 3.5 % (between *S. uruma* and *S. niger bilineatus* and between *S. uruma* and *S. calcitrans* populations, respectively) to 19.9 % (between *S. indicus* and *S. pallidus*).

The alignment of ITS2 rDNA produced sequences of 426 bp in length, including indels. 65bp of unalignable hypervariable regions were excluded from further analyses. The remaining 361 contained 164 (45.4 %) variable sites of which 137 (37.9 %) were informative. Modeltest identified the HKY +G model as the best model for phylogenetic analysis (lnL= -2179.57). The gamma distribution shape parameter (G) was 0.373. Genetic distances among species ranged from 2.6 % (between *S. bengalensis* Picard and *S. sitiens*) to 31.7 % (between *S. niger bilineatus* and *S. transvittatus*). The genetic distance between *S. niger niger* and *S. niger bilineatus* was 14.3 %.

The COI and Cyt-b datasets were incongruent with each other as well as with rDNA data. Results of ILD test are shown in table 4. Some authors have suggested that datasets suspected of incongruency should not be combined, whereas other authors disagree (DeSalle & Brower, 1997; Sallum *et al.*, 2002). We chose to analyse the incongruent datasets in all possible combinations. In general, when datasets disagree about the monophyly of a clade, the support for that clade is reduced when the datasets are combined. Otherwise, when the datasets are in

agreement, the support for the clade increases in the topology inferred from combined data (Sallum *et al.*, 2002). Our results show that even when datasets were considered incongruent by the ILD test (Farris *et al.*, 1994), the overall support was greater in the combined topology than for the topologies derived from each datasets taken alone.

Phylogenetic relationships

Nuclear gene. ML and Bayesian analyses showed *S. indicus* as sister to remaining *Stomoxys* species (Fig. 1). The Bayesian construction shows a better resolution than ML. The ITS2 topology showed a distinct group containing *S. pallidus* Roubaud, *S. omega* Newstead, *S. inornatus* Grünberg and *S. transvittatus* Villeneuve. The analysis placed *P. saegerae* within the *Stomoxys* group.

Combined mitochondrial and nuclear genes. Phylogenetic relationships

The total number of nucleotide positions in the concatenation was 1701. The phylogenies obtained from ML and Bayesian methods were very similar overall (Fig. 2). There is strong support for *S. indicus* appearing in a basal position within the *Stomoxys* group (PP = 1.00 and BP_{ML} = 99, respectively). We differentiate three major clades from Bayesian inference tree. The first clade (clade A) includes only *S. indicus*, an Asian species. The second clade (clade B) groups African species (*S. pallidus*, *S. omega*, *S. transvittatus* and *S. inornatus*). The third clade (clade C) groups all the remaining species containing cosmopolitan, African and Asian species (Fig. 1). The analysis also placed *Prostomoxys saegerae* as a sister group to *S. varipes* within the *Stomoxys* group rendering it paraphyletic with strong support (Fig. 2).

Estimation of Divergence time

The divergence time estimates were represented as a chronogram where branching nodes correspond to means of the posterior distributions for the node age with associated 95% CredI (Fig. 4). The divergence time between the *Stomoxys* genus and its *Haematobia* + *Haematobosca* sister-clade is estimated around 30.8 Mya (95% CredI: 22.3-40.3). The separation between *S. indicus* and other *Stomoxys* species is estimated to have occurred about 27 Mya (95% CredI: 18.9-36.6). The major lineages of *Stomoxys* were present by the late Oligocene and Miocene, whilst the greatest amount of cladogenesis occurring during early Miocene.

Discussion

Mitochondrial versus nuclear genes

When mitochondrial genes have been used in combination with nuclear genes it has generally been observed that nuclear gene have greater phylogenetic resolving power. Mitochondrial genes show higher levels of homoplasy and often are less useful than nuclear genes, especially at higher levels (Lin & Danforth, 2004). The gamma distribution shape parameter (G), recoded with our data set, shows a greater values for ITS2 than COI and Cyt-b (0.373, 0.2 and 0.258 respectively). A higher value of (G) indicates a better performance.

Phylogenetic relationship the Stomoxys genus

The phylogenetic analyses performed in the present study allowed reconstructing a robust phylogenetic framework for the major constitutive species of the genus *Stomoxys* and closely related genera. Our analyses strongly support the monophyly of Stomoxyini including a monophyletic group consisting of *Haematobia* and *Haematobosca* as a sister-clade to all remaining Stomoxyini.

However, according to our results the genus *Stomoxys* sensu stricto is found to be paraphyletic due to the unexpected position of *Prostomoxys saegerae* well nested within the *Stomoxys* group as a sister-group to *S. varipes* (Fig. 1 and 2). Zumpt (1973) created the genus *Prostomoxys* for the sole species *P. saegerae*. According to Zumpt's Stomoxyini key, *Prostomoxys* is characterized by maxillary palps as long as the proboscis, whereas *Stomoxys* is characterized by palps shorter than half the length of the proboscis. This key includes no other diagnostic character. Zumpt (1973) mentioned that the plesiomorphic form of the Stomoxyini mouth-parts can be accepted as the maxillary palps being about as long as the proboscis. However, it was reported that the overlap of intra- and interspecific variability in Diptera ranges from 0 to 15.5% (Meier *et al.*, 2006). Based on our phylogenetic study there appears to be no reason to incorporate this species in a separate genus as *P. saegerae* seems to be closely related to *Stomoxys* species. *Prostomoxys* should thus be synonymized with *Stomoxys*, and the species *Prostomoxys saegerae* must be renamed into *Stomoxys saegerae*. The long palp characters would be better considered as mere specific traits, since they are likely to be plesiomorphic.

Within *Stomoxys* sensu largo (including *P. saegerae*), our phylogenetic analyses strongly support the placement of *S. indicus* as the sister-group to the remaining *Stomoxys* species. Taxonomically, *S. indicus* is considered to be highly variable, with a number of synonyms used in the entomological literature. As mentioned by Zumpt (1973): “it is possible that a numerical taxonomic study based on great numbers of specimens from various populations may reveal that several subspecies may be retained in the future”. This species is described as the most common *Stomoxys* species in the Oriental region after *S. calcitrans* and has been recorded from India to the Pacific islands of Fiji and Samoa, including China and Japan. Its geographic range also reaches the Palearctic region (Zumpt, 1973). It has also been recorded in a number of South-East Asian countries such as Thailand (Masmeatathip *et al.*, 2006), Malaysia, Viet Nam, Taiwan, Borneo, Sumatra, and Java (Zumpt, 1973). Since both of our samples are from Thailand origin, they provide no information on the genetic diversity among populations of the species.

The remaining *Stomoxys* species included in our study are divided in two main clades. Clade B contains only African species and clade C groups African and more geographically widespread species (Fig. 2). Clade B groups together *S. transvittatus*, *S. inornatus*, *S. omega* and *S. pallidus* from different parts of the Ethiopian region. These species are ubiquitous and are restricted mainly to forest ecotones, where they feed especially on wildlife fauna (Mavoungou *et al.*, 2008). This major clade appears to be divided in two main subclades associating *S. inornatus* and *S. transvittatus* on one side, and *S. pallidus* and *S. omega*, on the other side. It has been reported that *S. inornatus* and *S. transvittatus* have a diurnal activity, with both bimodal or unimodal patterns depending on the environment. In contrast, *S. omega* and *S. pallidus* have a crepuscular activity, which is often bimodal (Duvallat, unpublished data). The information content of ecological data for phylogeny is however limited since activity levels in *Stomoxys* are highly dependent upon geographical origin (primary forest, secondary forest and human-modified areas...), climate (temperature, humidity and level of solar radiation...), trapping method, and the physiological state of insects (Simmond, 1944; Kangwagye, 1974; La Breque *et al.* 1975; Charlwood & Lopes, 1980; Mavoungou *et al.*, 2008).

Clade C is divided into three subclades, two of them being exclusively African, and one being more geographically widespread. The first subclade associates *P. saegerae* and *S. varipes*, whereas the second subclade associates *S. niger niger* and *S. niger bilineatus*, considered as two subspecies according to Zumpt (1973). Solving species boundaries between closely

related species is notoriously difficult. Based on the tree topology, *S. niger niger* and *S. niger bilineatus* sequences form each one a specific clusters. Pairwise distance between *S. niger niger* and *S. niger bilineatus*, based on COI sequences, was 8.2%. The use of DNA sequences for species delimitation is widely criticized (Tautz *et al.*, 2002; DeSalle *et al.*, 2005; Meier *et al.*, 2006). The wide overlap between intraspecific and interspecific diptera variability (0% to 15.5%) recorded by Meier *et al.* (2006), is problematic since the pairwise distance for these subspecies falls into this overlap area. However the genetic distance between *S. niger niger* and *S. niger bilineatus* based on the nuclear ITS2 is also quite large 14.3 %. Our molecular dating analysis estimates the separation between the two subspecies around 16.3 Mya (Fig. 2). This is almost as old as the separation between *S. inornatus* and *S. transvittatus* (c.a. 16.4 Mya), more than the divergence between *S. omega* and *S. pallidus* (c.a. 12.4 Mya), and even more than the split between *S. varipes* and *P. saegerae* (c.a. 14.2 Mya) (Fig. 4).

Morphologically, *S. niger niger* and *S. niger bilineatus* are distinguished only by the color of their tibiae and tarsi. Mavoungou *et al.* (2008) described *S. niger bilineatus* and *S. niger niger* as sympatric species, the former being abundant in savannas with abundant wild fauna, while the latter is more associated with anthropized area. Mihok (1996) also pointed out differences in habitat affinities, sex ratio and activity patterns between these species. Given morphological, ecological isolation and molecular data, it appears very likely that *S. niger niger* and *S. niger bilineatus* belong to different species. *S. niger bilineatus* specimens from the British Museum have been already labelled as *S. bilineatus*. Consequently, we suggest raising them to full specific status and to use as species names *S. niger* and *S. bilineatus*.

Finally, the third subclade within clade C associates *S. calcitrans*, *S. sitiens* and *S. bengalensis*. *S. bengalensis* occurs only in Asia, *S. sitiens* is found in both African and Asian continents, while the livestock pest *S. calcitrans* has a worldwide distribution. *S. calcitrans* and *S. sitiens* invariably appeared to be human commensals since they have unvariably been found in association with human activity, including inside buildings.

Molecular timescale and biogeography of the Stomoxys group

Our estimation for Stomoxyini and Muscini divergence time corresponds to the Late Eocene (c.a. 34.9 Mya) (Fig. 4). This estimate is compatible with the record of the oldest Muscidae fossils in the Eocene and the Lower Miocene, 20–50 Mya (Evenhuis, 1994). The oldest Muscini fossil (about 15-20 Mya) was described from Dominican amber (Pont & De Carvalho, 1997), whereas, no Stomoxyini fossil has been found. Results presented here show that the radiation of the major Stomoxyini group is overlapped largely to the hypothetical time

span during which temperate forests developed in the Northern Hemisphere (mid-Oligocene to mid-Miocene) (Guo *et al.*, 2002) .

Stomoxys genus appears to diverge from other Stomoxyini genera around the Oligocene (c.a. 30.8 Mya). An Oriental origin of the *Stomoxys* genus sensu largo ancestor is suggested, owing to the strong support for the basal branching of *S. indicus* and its absence from Africa. Then, the common ancestor of *Stomoxys* would have split into two groups in late Oligocene - early Miocene, with one group present in the Oriental region while another colonized Africa. The collision between Eurasia and the Arabo-African plate was initiated by the Oligocene, but the Early Miocene period seems to have been key for the establishment of intercontinental pathways permitting faunal exchanges between the Afro-Arabian plate and Asia (Bernor *et al.*, 1987). Migration events continued until the Late Miocene permitting the occurrence of *S. calcitrans* and *S. sitiens* in both the African and Asian continents. Migration until the Late Miocene may have been facilitated by a forest connection that existed between the African and Oriental regions (Moreau, 1963).

In conclusion, our study can be considered a first step into the molecular phylogenetic analysis of the *Stomoxys* genus, and our results point out a need to deeply revise the Stomoxyini tribe taxonomy. Since very few data in the biology and the ecology of this group are available currently, our study also identifies the strong need of a better knowledge in these fields of research, to better understand, in a biogeographic context, how these species appeared, radiated and differentiated.

Acknowledgements

We thank Jacques-François Mavoungou (Gabon), Roundthip Masmeatathip (Thailand), Alekaw Sinshaw Tegege (Ethiopia) and the British Museum for providing some *Stomoxys* samples. We extend our thanks to Gwenaëlle Mondor (CBGP) for technical assistance. This study was partially supported by Agence Nationale de la Recherche through the ANR-Biodiv grant IFORA (Iles Forestières Africaines) to Michel Veuille, and by the CNS-Genoscope “Barcoding insects for identification” sequencing grant to Michel Veuille. During the course of this research, N. D.-A. was partially supported by a grant from Société Entomologique de France.

Table 1. Species distribution mentioned by Zumpt, 1973.

Species	Distribution
<i>S. bengalensis</i> Picard	India to Java
<i>S. boueti</i> Roubaud	Bénin (ex-Dahomey), Congo
<i>S. calcitrans</i> (Linnaeus)	Cosmopolitan
<i>S. indicus</i> Picard	Oriental region and neighbouring Palaearctic territories
<i>S. inornatus</i> Grünberg	Tropical Africa
<i>S. luteolus</i> Villeneuve	Central and East Africa
<i>S. niger</i> Macquart	
<i>S. niger niger</i>	Ethiopian and Madagascan regions
<i>S. niger bilineatus</i>	Ethiopian and Madagascan regions
<i>S. ochrosoma</i> Speiser	Central and East Africa
<i>S. omega</i> Newstead	Ethiopian Region
<i>S. pallidus</i> Roubaud	Tropical Africa
<i>S. pullus</i> Austen	India
<i>S. sitiens</i> Rondani	Ethiopian and oriental regions, in Egypt it reaches the Palearctic region
<i>S. stigma</i> Van Emden	Uganda- Congo
<i>S. taeniatus</i> Bigot	Ethiopian region
<i>S. transvittatus</i> Villeneuve	Southern and Central Africa
<i>S. uruma</i> Shinonaga & Kano	Oriental region
<i>S. varipes</i> Bezzi	East and central Africa Southward to Rhodesia
<i>S. xanthomelas</i> Roubaud	Congo- Tanzania- Uganda

Table 2. Species studied, source localities, and Gene Bank accession numbers

Species	Locality	COI Accession no	CytB Accession no	ITS2 Accession no
<i>S. calcitrans</i>	India	EU836073-EU836074	EU851301	-
	Thailand	EU836075-EU836082	EU851303-EU851308	EU851200-EU851208
	Gabon	EU836071-EU836072	EU851298-EU851300	-
	Ethiopia	-	EU851296-EU851297	-
	Cameroun	EU836070	EU851302	EU851199
	Burkina	EU836069	-	-
	Brazil	AY526197*	DQ533708*	EF560191*
<i>S. indicus</i>	Thailand	EU836083-EU836092	EU851309-EU851318	EU851209-EU851218
<i>S. sitiens</i>	Thailand	EU836131-EU836138	EU851357-EU851364	EU851251-EU851257
	Burkina	FJ386382	FJ386381	-
<i>S. bengalensis</i>	Thailand	EU836060-EU836068	EU851281-EU851288	EU851191-EU851198
<i>S. niger niger</i>	Gabon	EU836110-EU836115	EU851327-EU851333	EU851228-EU851237
	Burkina	EU836109	-	-
<i>S. niger bilineatus</i>	Gabon	EU836101-EU836108	EU851289-EU851295	EU851219-EU851227
<i>S. varipes</i>	Ethiopia	EU836147-EU836148	EU851372-EU851374	EU851189-EU851190
<i>S. transvittatus</i>	Gabon	EU836139-EU836145	EU851365-EU851370	EU851258-EU851265
<i>S. inornatus</i>	Gabon	EU836093-EU836100	EU851319-EU851326	EU851179-EU851188
<i>S. omega</i>	Gabon	EU836116-EU836121	EU851339-EU851346	EU851238-EU851244
<i>S. pallidus</i>	Gabon	EU836122-EU836130	EU851347-EU851356	EU851245-EU851250
<i>S. uruma</i>	Thailand	EU836146	EU851371	-
<i>P. saegerae</i>	Gabon	EU836055-EU836059	EU851275-EU851280	EU851266-EU851270
<i>H. croceicornis</i>	Gabon	EU836053-EU836054	EU851273-EU851274	EU851271-EU851272
<i>H. irritans</i>	-	AY526195*	DQ029097*	DQ437515*
<i>M. domestica</i>	-	AF104622*	DQ657064*	Z28417*

The sequences marked with an asterisk (*) were obtained from GeneBank, (-) no available data

Table 3. COI, Cyt-b and ITS2 Primers for amplifications and sequencing

Primers	Sequences (5'-3')	Reference
C1-J-2813	CAACATTTATTTTGATTTTTTGG	Simon <i>et al.</i> , 1994; 2006
TL2-N-3014	TCCATTGCACTAATCTGCCATATTA	
CB-J10933	GTTTTACCTTGAGGACAAATATC	Simon <i>et al.</i> , 1994
CB-N11526	TTCAACTGGTCGAGCTCCAATTCA	
ITS2A	TGTGAACTGCAGGACACAT	Sharpe <i>et al.</i> , 2000
ITS2B	TATGCTTAAATTCAGGGGGT	

Table 4. Mean nucleotide frequencies for the genes used in this study and ILD test results

Genes	A	C	G	T	A+T %	Model test	ILD test
COI	0.311	0.140	0.142	0.405	71.6	GTR+ I+G	-
Cyt-b	0.321	0.144	0.112	0.421	74.2	GTR+ I+G	-
ITS2	0.361	0.100	0.168	0.370	73.1	HKY+ G	-
COI/ Cyt-b	0.315	0.142	0.129	0.411	72.6	GTR+ I+G	0.01
COI/ Cyt-b/ ITS2	0.324	0.135	0.136	0.403	72.7	GTR+ I+G	0.001

Table 5. Estimates of Evolutionary Divergence over mitochondrial DNA Sequence Pairs (COI and Cyt-b). The number of base substitutions per site from averaging over all sequence pairs between species is shown for COI and Cyt-b respectively in the lower left and in the upper right.

<i>M. domestica</i>	0.116	0.113	0.245	0.130	0.168	0.144	0.173	0.179	0.175	0.173	0.154	0.159	0.178	0.242	0.185	0.224	0.227	0.196	
<i>H. irritans</i>	0.183		0.118	0.211	0.147	0.149	0.112	0.140	0.132	0.129	0.147	0.135	0.139	0.135	0.184	0.133	0.166	0.178	0.173
<i>H. croceicornis</i>	0.161	0.135		0.190	0.112	0.126	0.092	0.117	0.112	0.109	0.118	0.103	0.107	0.125	0.172	0.143	0.163	0.177	0.157
<i>S. indicus</i>	0.206	0.245	0.173		0.185	0.163	0.092	0.137	0.134	0.130	0.115	0.112	0.119	0.119	0.114	0.129	0.141	0.196	0.165
<i>P. saegerae</i>	0.207	0.178	0.187	0.247		0.107	0.077	0.093	0.100	0.097	0.099	0.092	0.088	0.092	0.157	0.122	0.123	0.138	0.137
<i>S. varipes</i>	0.213	0.185	0.158	0.171	0.098		0.069	0.090	0.081	0.078	0.086	0.079	0.076	0.088	0.123	0.128	0.129	0.162	0.127
<i>S. uruma</i>	0.202	0.186	0.138	0.177	0.083	0.115		0.039	0.041	0.039	0.041	0.030	0.033	0.034	0.087	0.066	0.107	0.099	0.080
<i>S. bengalensis</i>	0.220	0.183	0.150	0.171	0.116	0.089	0.098		0.079	0.076	0.069	0.057	0.060	0.056	0.111	0.109	0.147	0.103	0.118
<i>S. sitiens Asia</i>	0.195	0.211	0.169	0.190	0.085	0.101	0.097	0.072		0.006	0.082	0.075	0.072	0.072	0.116	0.075	0.125	0.117	0.108
<i>S. sitiens Burkina</i>	0.225	0.237	0.191	0.183	0.109	0.099	0.130	0.076	0.078		0.079	0.073	0.069	0.070	0.111	0.073	0.122	0.125	0.105
<i>S. calcitans Africa</i>	0.222	0.176	0.169	0.186	0.124	0.080	0.123	0.093	0.108	0.112		0.013	0.006	0.065	0.139	0.102	0.133	0.132	0.122
<i>S. calcitrans Asia</i>	0.199	0.173	0.172	0.180	0.112	0.085	0.122	0.091	0.093	0.091	0.026		0.007	0.053	0.122	0.098	0.124	0.116	0.110
<i>S. calcitrans Brazil</i>	0.208	0.159	0.157	0.187	0.121	0.078	0.126	0.093	0.105	0.109	0.006	0.024		0.056	0.126	0.102	0.120	0.120	0.114
<i>S. niger bilineatus</i>	0.224	0.170	0.182	0.219	0.130	0.083	0.138	0.115	0.129	0.145	0.097	0.102	0.089		0.082	0.061	0.095	0.098	0.078
<i>S. niger niger</i>	0.207	0.203	0.156	0.185	0.100	0.051	0.102	0.081	0.108	0.100	0.076	0.077	0.075	0.085		0.131	0.134	0.170	0.129
<i>S. inornatus</i>	0.187	0.187	0.131	0.164	0.081	0.073	0.071	0.090	0.098	0.086	0.092	0.098	0.098	0.102	0.081		0.137	0.148	0.084
<i>S. omega</i>	0.186	0.183	0.167	0.233	0.126	0.123	0.125	0.130	0.139	0.126	0.139	0.133	0.125	0.115	0.096	0.098		0.123	0.142
<i>S. pallidus</i>	0.159	0.183	0.178	0.209	0.132	0.111	0.142	0.143	0.147	0.146	0.143	0.143	0.132	0.124	0.092	0.108	0.077		0.153
<i>S. transvittatus</i>	0.201	0.188	0.184	0.240	0.116	0.129	0.123	0.109	0.131	0.119	0.118	0.127	0.115	0.143	0.110	0.129	0.129	0.138	

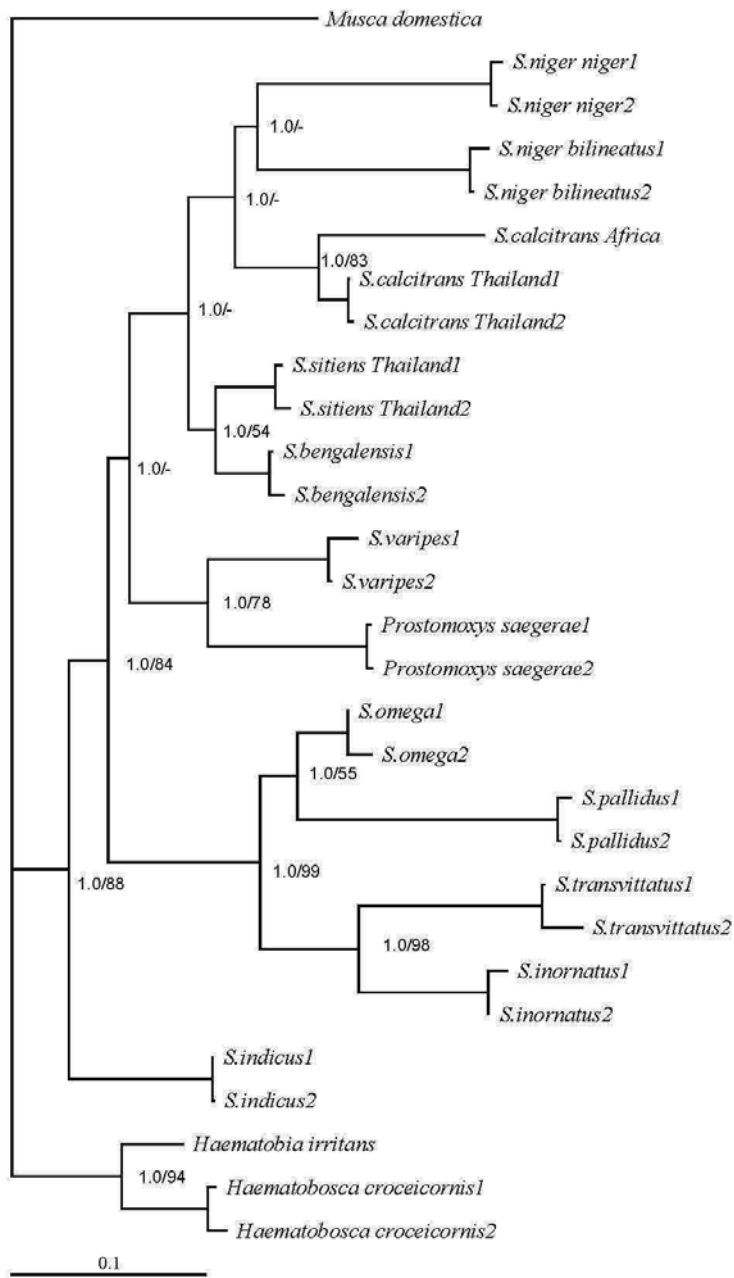


Fig. 1. Phylogenetic tree based on rDNA ITS2 sequences generated by the Bayesian inference. Numbers indicate the Posterior Probability of the associated clade/ the Bootstrap Probability above the 50% level.

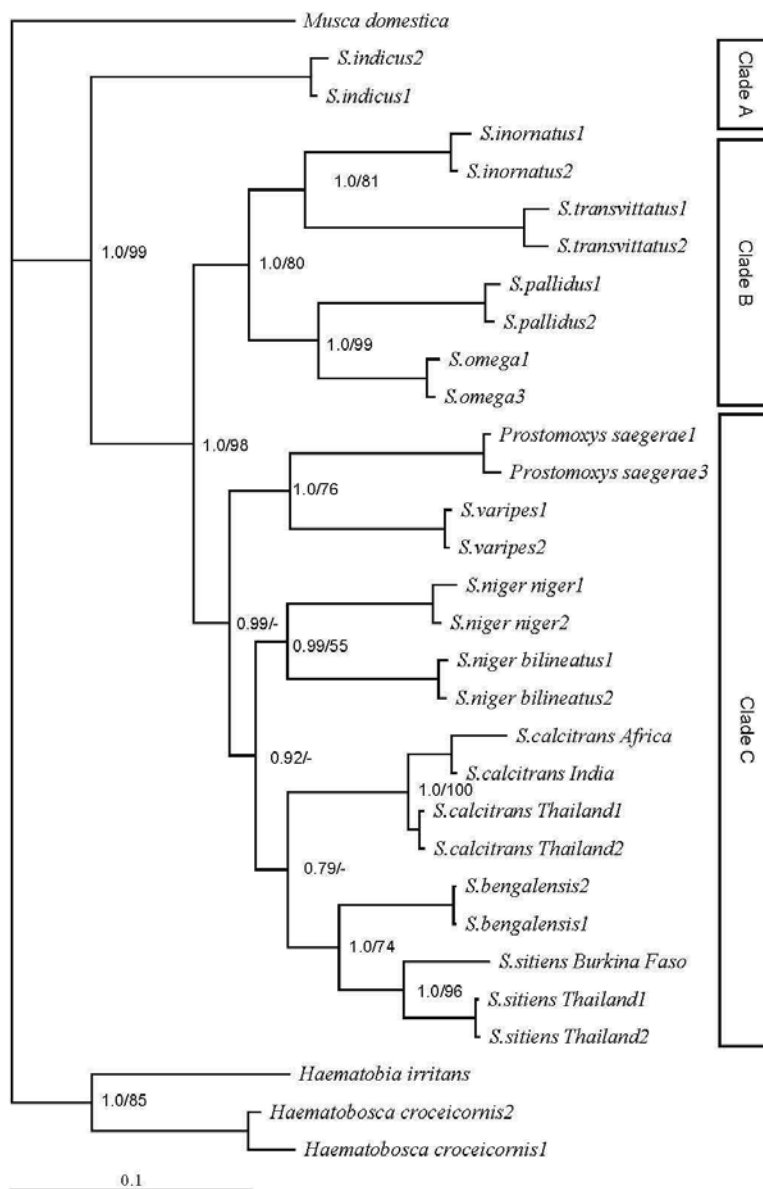


Fig 2: Consensus tree derived from the Bayesian inference for concatenated mt and nuclear genes. Numbers indicate the Posterior Probability of the associated clade/ the Bootstrap Probability above the 50% level.

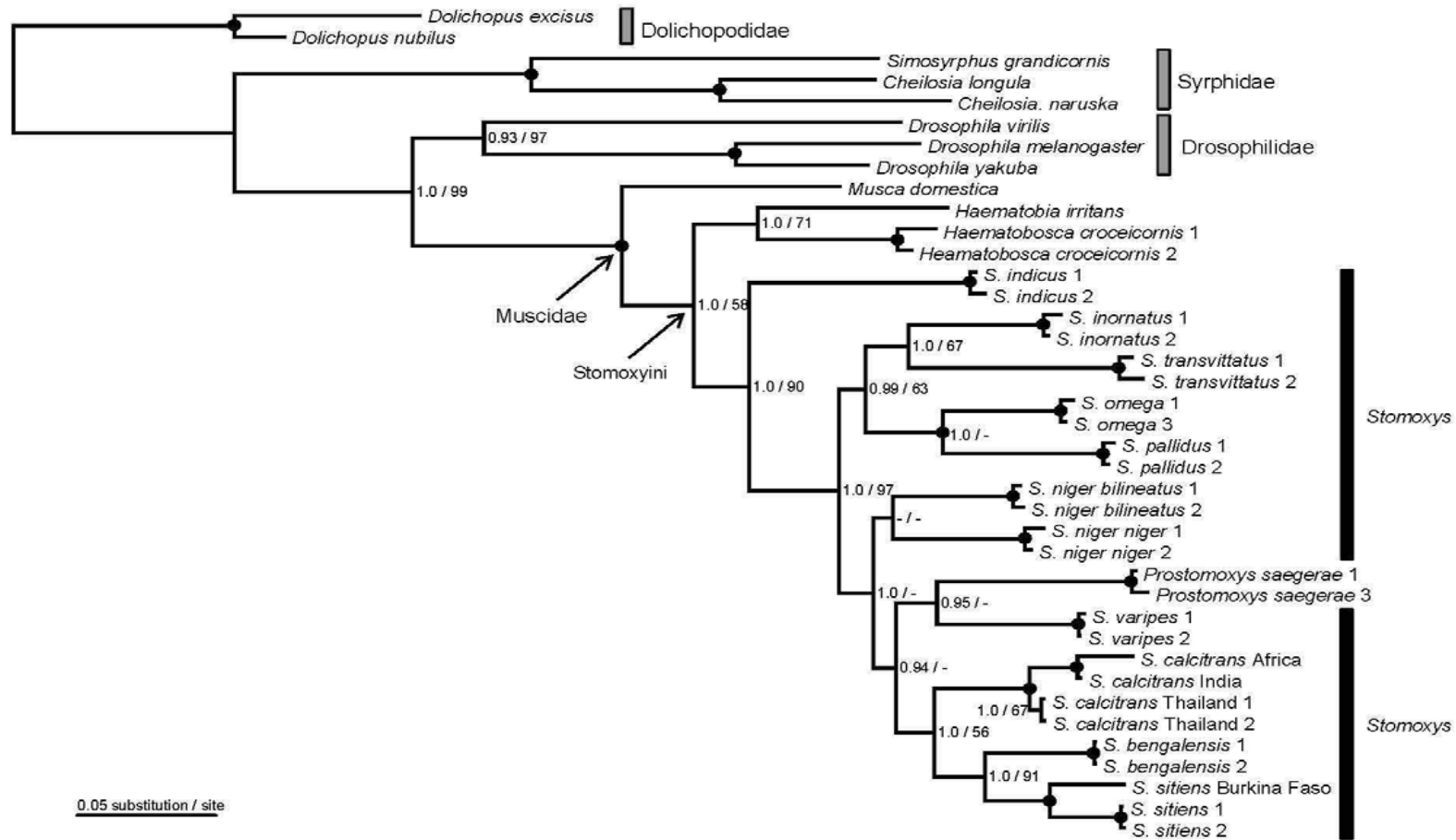


Fig. 3. Phylogenetic relationship inferred of 23 dipterans taxa from mitochondrial and nuclear sequences by the Bayesian inference. Numbers indicate the Posterior Probability of the associated clade/ the Bootstrap Probability above the 50% level.

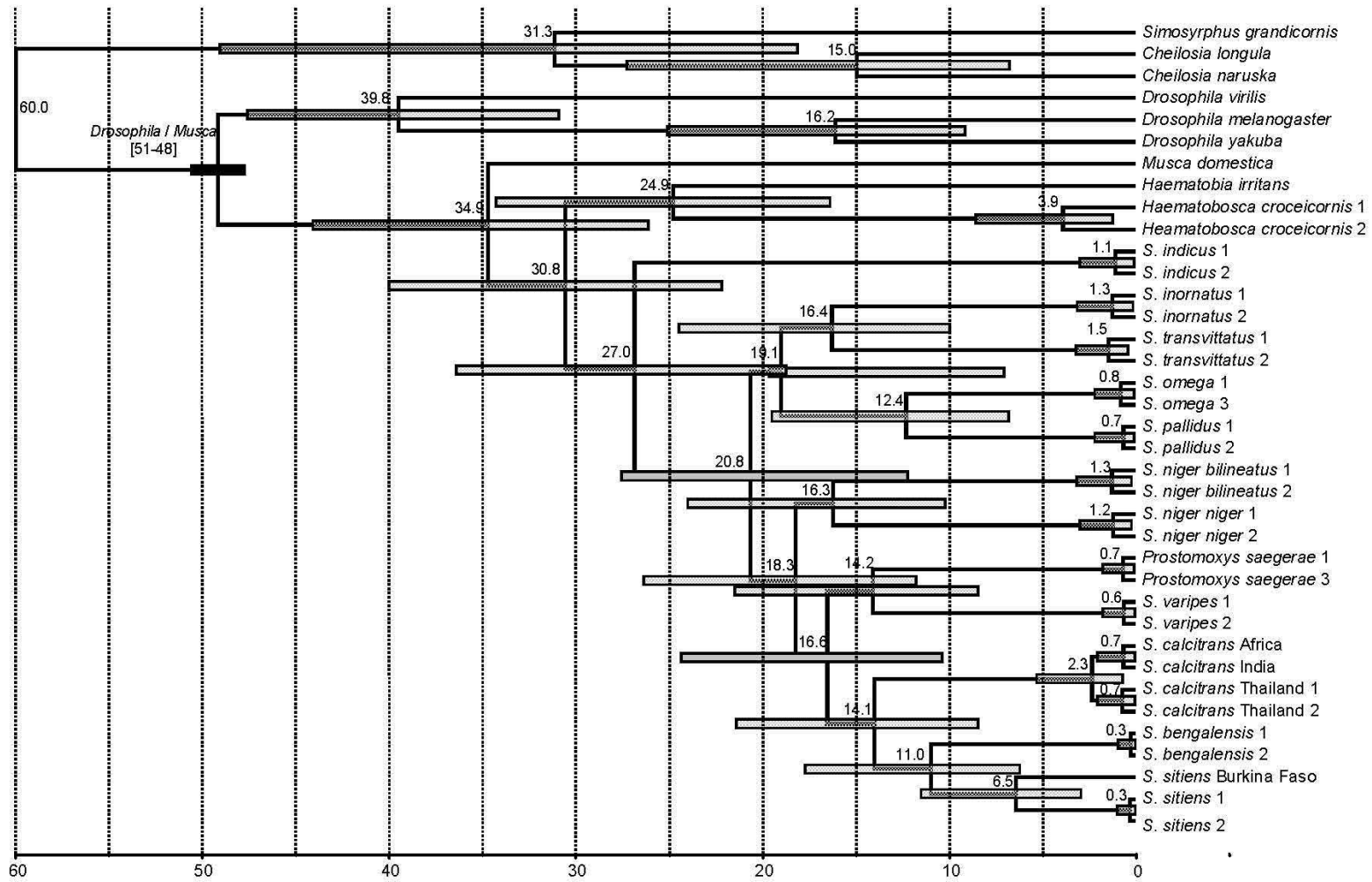


Fig. 4. Chronogram resulting from the multidivtime analysis of combined COI, Cyt-b and ITS2 sequences. Scale is in millions of years before present.

References

- Avise, J.C. (2004) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, New York.
- Bernor, R. L., Brunet, M., Ginsburg, L., Mein, P., Pickford, M., Rögl R., Sen S., Steininger F., & Thomas H. (1987) A consideration of some major topics concerning Old World Miocene mammalian chronology, migrations and paleogeography. *Geobios*, **20**, 431-439.
- Campbell, J.B., White, R.G., Wright, J.E., Crookshank, R. & Clanton, D.C. (1977) Effects of stable flies (Diptera-Muscidae) on weight gains and feed-efficiency of calves on growing and finishing rations. *Journal of Economic Entomology*, **70**, 592-594.
- Campbell, J.B., Skoda, S.R., Berkerile, D.R., Boxler, D.J., Thomas, G.D., Adams, D.C. & Davis, R. (2001) Effects of stable flies (Diptera: Muscidae) on weight gains of grazing yearling cattle. *Journal of Economic Entomology*, **94**, 780-783.
- Charlwood, J.D. & Lopes, J. (1980) The age-structure and biting behaviour of *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae) from Manaus, Brazil. *Bulletin of Entomological Research*, **70**, 549-555.
- Castresana, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution*, **17**, 540-552.
- Couri, M.S. & De Carvalho, C.J.B. (2003) Systematic relations among *Philornis* Meinert, *Passeromyia* Rodhain & Villeneuve and allied genera (Diptera, Muscidae). *Brazilian Journal of Biology*, **63**, 223–232.
- Couri, M.S. & Pont, A.C. (2000) Cladistic analysis of Coenosiini (Diptera: Muscidae: Coenosiinae). *Systematic Entomology*, **25**, 373-392.
- D'Amico, F., Gouteux, J.P., Le Gall, F. & Cuisance, D. (1996) Are stable fly (Diptera: Stomoxyinae) vectors of *Trypanosoma vivax* in the Central African Republic. *Veterinary Research*, **27**, 161-170
- De Carvalho, C.J.B. (1989) Classificação de Muscidae (Diptera): una proposta através da análise cladística. *Revista Brasileira de Zoologia*, **6**, 627–648.
- De Carvalho, C.J.B., Couri, M.S., Pont, A.C., Pamplona, D.M. & Lopes S.M. (2005) A catalogue of the Muscidae (Diptera) of the Neotropical region. *Zootaxa*, **860**, 1–282.
- De Carvalho, C.J.B. & Pont, A.C. (2006) Taxonomy, cladistics and biogeography of the South American *Brachygasterina* Macquart (Diptera: Muscidae). *Zootaxa*, **1151**, 1-26.

- DeSalle, R. & Brower, A.V. (1997) Process partitions, congruence, and the independence of characters: inferring relationships among closely related Hawaiian *Drosophila* from multiple gene regions. *Systematic Biology*, **46**, 751-64.
- DeSalle, R., Egan, M.G. & Siddal, M. (2005) The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **360**, 1905-1916.
- Douzery, E.J., Delsuc, F. & Philippe, H. (2006) Molecular dating in the genomic era. *Médecine Sciences*, **22** (4), 374-380.
- Evenhuis, N.L. (1994) Catalogue of the fossil flies of the world (Insecta: Diptera), Backhuys, Leiden.
- Farris, J. S., Källersjö, M., Kluge, A. G. & Bult, C. (1994) Testing significance of incongruence. *Cladistics*, **10**, 315–319.
- Foil, L.D. & Gorham, J.R. (2000) Mechanical transmission of disease agents by arthropods. *In : B.F. Eldridge and J.D. Edman, Medical Entomology. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers: 461-514.*
- Guindon, S. & Gascuel, O. (2003) A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, **52**, 696–704.
- Guo, Z.T., Ruddiman, W.F., Hao, Q.Z., Wu, H.B., Qiao, Y.S., Zhu, R.X., Peng, S.Z., Wei, J.J., Yuan, B.Y. & Liu, T.S. (2002) Onset of Asian desertification by 22 Myr ago inferred from loess deposits in China. *Nature*, **416**:159-163.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95-98.
- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogentic tree. *Bioinformatics*, **17**, 754-755.
- Kangwagye, T.N. (1974) The seasonal incidence of biting flies (Diptera) in Rwenzori National Park and Kigezi Game Reserve, Uganda. *Bulletin of Entomological Research*, **63**, 535-549.
- Knapp, M., Stöckler, K., Havell, D., Delsuc, F., Sebastiani, F. & Lockhart, P.J. (2005) Relaxed molecular clock provides evidence for long-distance dispersal of *Nothofagus* (southern beech). *PLoS Biology*, **3** (1), 38-43.
- La Breque, G.C., Weidhaas, D.E. & Whitfield, T.L. (1975) Graphic models as intermediate steps to computerized simulations of stable fly populations. *Mosquito News*. **35**, 316-321.

- Lin Chung, P., & Danforth, B. N. (2004) How do insect nuclear and mitochondrial gene substitution patterns differ? Insights from Bayesian analyses of combined datasets. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **30**, 686-702.
- Masmeatathip, R., Gilles, J., Ketavan, C. & Duvallet, G. (2006) First survey of seasonal abundance and daily activity of *Stomoxys spp.* (Diptera: Muscidae) in Kamphaengsaen campus, Nakornpathom Province Thailand. *Parasite*, **13**, 245-250.
- Mavoungou, J.F., Jay-Robert P., Gilles J., Atsame E.A. & Duvallet, G. (2008) Ecology of *Stomoxys* flies (Diptera: Muscidae) in Gabon. First survey in different ecological areas. *Parasite*, **15**, 27-34.
- Meier, R., Shiyang, K., Vaidya, G. & Ng, P.K.L. (2006) DNA Barcoding and Taxonomy in Diptera: a tale of high Intraspecific Variability and Low Identification Success. *Systematic Biology*, **55** (5), 715-728.
- Mihok, S., Opiyo, M., Eli, M. & Khalfan, S. (1996) Phenology of Stomoxinae in a Kenya forest. *Medical and Veterinary Entomology*, **10**, 305-316.
- Miller, R. W., Pickens, L. G., Morgan, N. O., Thimijan, R. W. & Wilson, R. L. (1973) Effect of stable flies on feed intake and milk production of dairy cows. *Journal of Economic Entomology*, **66**, 711 – 713.
- Moreau, R.E. (1963) Vicissitudes of the African biomes in the late Pliocene. *Proceedings of the Zoological Society of London*, **141**, 395.
- Nihei, S.S. & De Carvalho, C.J.B. (2007) Phylogeny and classification of Muscini (Diptera, Muscidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, **149**, 493–532.
- Pont, A.C. & De Carvalho, C.J.B. (1997) Three species of Muscidae (Diptera) from Dominican amber. *Studia Dipterologica*, **4**, 173–181.
- Pont, A.C. & Dsouli, N. (2009) A new species of *Haematobosca* Bezzi from Gabon (Diptera: Muscidae). *Studia dipterologica*, in press.
- Posada, D. & Crandall, K.A. (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, **14**, 817–818.
- Sallum, M. A. M., Schultz, T. R., Foster, P. G., Aronstein, K., Wirtz, R. A. & Wilkerson, R. C. (2002) Phylogeny of Anophelinae (Diptera: Culicidae) based on nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. *Systematic entomology*, **27**, 361-382.

- Schuehli, G.S. & De Carvalho, C.J.B. (2005). Revision and cladistics of the Neotropical genus *Pseudoptilolepis* Snyder (Diptera, Muscidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, **22**, 23–34.
- Sharpe, R. G., Harbach, R.E. & Butlin, R.K. (2000) Molecular variation and phylogeny of members of the Minimus group of *Anopheles* subgenus *Cellia* (Diptera: Culicidae). *Systematic Entomology*, **25**, 263-272.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Lui, H. & Flook, P. (1994) Evolution, weighting and phylogenetic unity of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of Entomological Society of America*, **87**, 651-701.
- Simon, C., Buckley, T.R., Frati, F., Stewart, J.B. & Beckenbach, A.T. (2006) Incorporating Molecular Evolution into Phylogenetic Analysis, and a New Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers for Animal Mitochondrial DNA. Supplemental Material. *Annals of Entomological Society of America*, **37**, 545-79.
- Simmonds, S.W. (1944) Observations on the biology of the stable fly in Florida. *Journal of Economic Entomology*, **37**, 680-686.
- Swofford, D.L. (2002) PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). *Sinauer Associates, Sunderland MA*.
- Tamura, K., Nei, M. & Kumar, S. (2004) Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, **101**, 11030-11035.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007) *MEGA4*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 1596-1599.
- Tautz, D., Arctander, P., Minelli, A., Thomas, R. H. & Vogler A.P. (2002) DNA points the way ahead in taxonomy. *Nature*, **418**, 479.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (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.
- Thorne, J.L. & Kishino, H. (2002) Divergence time and evolutionary rate estimation with multilocus data. *Systematic Biology*, **51**, 689-702.
- Wiegmann, B.M., Yeates, D. K., Thorne, J.L. & Kishino, H. (2003) Time Flies, a New Molecular Time-Scale for Brachyceran Fly Evolution without a Clock. *Systematic Biology*, **52**, 745-756.

Wilcox, T.P.D., Zwickl, J., Heath, T. & Hillis, D.M. (2002) Phylogenetic relationships of the dwarf boas and a comparison of Bayesian and bootstrap measures of phylogenetic support. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **25**, 361–371.

Yang, Z. (2007) PAML 4: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1586-1591 (<http://abacus.gene.ucl.ac.uk/software/paml.html>).

Zumpt, F. (1973) The Stomoxyinae biting flies of the world. Taxonomy, biology, economic importance and control measures. *Gustav Fischer Verlag, Stuttgart*, 175pp.

Discussion générale

La phylogénie, qu'elle soit morphologique ou moléculaire, a longtemps tenté d'expliquer la diversité actuelle des organismes. En débutant ce travail, nous nous proposons de clarifier les relations phylogénétiques entre les espèces du genre *Stomoxys*. Nous avons choisi de construire l'histoire évolutive du genre par le biais de caractères morphologiques et moléculaires (mitochondrial et nucléaire), en utilisant différentes méthodes (parcimonie, maximum de vraisemblance et bayésienne).

La confrontation des phylogénies morphologiques et moléculaires, montre une incongruence des résultats. La phylogénie morphologique supporte la monophylie du genre *Stomoxys* tandis que la phylogénie moléculaire supporte la paraphylie du genre. L'incongruence des données morphologiques et moléculaires peut être due à divers facteurs: la taille des échantillons analysés, le nombre de caractères, la méthode de construction d'arbre inadaptée au mode d'évolution des caractères, des vitesses d'évolution des caractères moléculaires différentes entre les lignées, et même parfois une insuffisance des gènes en tant que marqueurs de l'histoire des espèces (Harry, 2001).

L'analyse par parcimonie des 27 caractères morphologiques aboutit à un arbre phylogénétique en mutifurcation. Nos résultats montrent que les critères morphologiques actuellement utilisés dans la classification des stomoxes ne sont pas utilisables pour délimiter des groupes naturels. Seule une pondération des caractères a permis de faire apparaître trois clades. Pondérer un caractère, c'est lui donner a priori une plus grande importance lors de l'inférence de l'arbre le plus parcimonieux. Le résultat d'une telle pondération serait d'augmenter les chances pour que les taxons partagent ce caractère artificiellement dupliqué se trouvent étroitement apparentés et d'obtenir pratiquement le résultat phylogénétique que l'on souhaite (Darlu & Tassy, 1993). La pondération des caractères morphologiques suscite de nombreuses controverses entre phylogénéticiens, particulièrement en ce qui concerne les caractères adaptatifs souvent considérés a priori mauvais car facilement soumis aux phénomènes d'homoplasie. Cependant, l'identification d'un caractère adaptatif ou non adaptatif est aussi controversée que la pondération et la compréhension de la fonction de ce caractère n'est donc pas garante de sa signification phylogénétique.

La pondération des caractères morphologiques nous a permis de discerner trois clades différents: Le premier clade (A) comprend des espèces exclusivement de la région Ethiopienne, inféodées à la forêt primaire (*S. transvittatus*, *S. inornatus*, *S. pallidus* et *S. omega*). Le deuxième clade comporte *S. niger niger*, *S. niger bilineatus* et *S. varipes*, se trouvant surtout en savane africaine

et ayant en commun des palpes maxillaires aussi longs que la gouttière labiale. En dernier, on trouve le groupement de *S. indicus*, *S. bengalensis*, *S. sitiens* et *S. calcitrans*, il s'agit particulièrement d'espèces asiatiques et d'une espèce cosmopolite. Ces espèces ont été décrites en milieu anthropisé, près des fermes d'élevage. Clairement, au niveau de ces trois clades, il s'agit d'espèces regroupées en fonction de leur adaptation environnementale.

La morphologie peut être erronée lorsque les similitudes morphologiques résultent d'une évolution convergente (cas particulier de l'homoplasie, mécanisme évolutif qui explique les ressemblances morphologiques, mais aussi comportementales, existant entre des espèces soumises aux mêmes contraintes environnementales). C'est le cas des drosophilidés des figes, les *Lissocephala*, dont les caractères morphologiques ne peuvent pas être utilisés pour retracer leur histoire évolutive du fait de leur nature adaptative (Harry *et al.*, 1998)

Pour cette analyse morphologique, le mieux aurait été de combiner les caractères morphologiques des adultes et des immatures. Il était donc nécessaire de poursuivre cette analyse phylogénétique avec d'autres caractères disponibles tels que les caractères moléculaires.

La combinaison de deux gènes mitochondriaux (COI et Cyt-b) et un gène nucléaire (ITS2) montre l'intrusion de *Prostomoxys saegerae* au sein du genre *Stomoxys*, ce qui suggère la paraphylie de ce groupe.

L'arbre phylogénétique obtenu présente trois clades distincts caractérisé par une forte constitution biogéographique. Le clade A comprend une espèce asiatique, le clade B contient des espèces strictement africaines et le clade C inclut des espèces africaines et des espèces à plus grande répartition. Le premier clade comprend *S. indicus*, espèce sœur des autres membres du groupe *Stomoxys*. L'embranchement basal de *S. indicus* serait en faveur d'une origine orientale du groupe *Stomoxys*. Un échantillonnage plus détaillé est nécessaire pour confirmer cette hypothèse.

Dans le deuxième clade, on retrouve les mêmes espèces décrites précédemment par les caractères morphologiques (*S. transvittatus*, *S. inornatus*, *S. pallidus* et *S. omega*). Ceci vient donc consolider ce cluster, qui apparaît étroitement lié à la forêt primaire.

Le troisième clade est formé à son tour par trois sous-clades. Le premier sous-clade inclut *S. varipes* et étonnamment *Prostomoxys saegerae*, un genre à part faisant partie de la tribu des Stomoxyini. *Prostomoxys* serait bien synonyme de *Stomoxys*, il conviendrait donc de renommer *Prostomoxys saegerae* en *Stomoxys saegerae*. Ainsi, le caractère morphologique retenu par Zumpt (1973) pour classer les genres de la tribu des Stomoxyini (longueur des palpes maxillaires par rapport à la taille du proboscis) pourrait être un caractère adaptatif issu d'une évolution convergente. Ceci montre l'importance de l'homoplasie dans l'évolution qui affecte

autant les traits comportementaux que morphologiques. Différentes phylogénies moléculaires ont été réalisées afin de déduire a posteriori des inférences quant aux états ancestraux ou dérivés des différents caractères. Il serait donc intéressant d'étendre l'analyse phylogénétique à l'ensemble de la tribu des Stomoxyini, afin obtenir un schéma complet de la distribution des caractères dans l'arbre phylogénétique et ainsi de comprendre la récurrence de certains caractères au niveau des différents taxons.

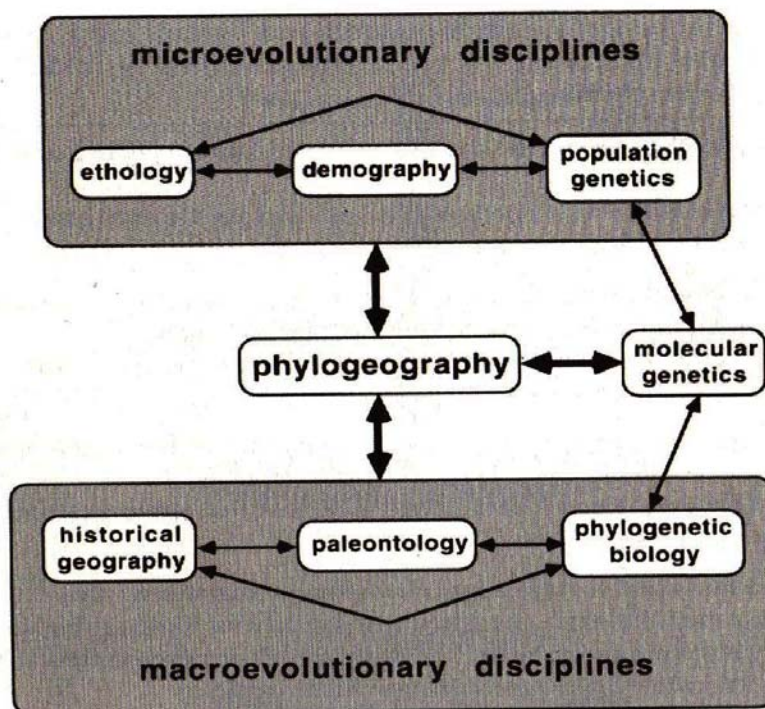
Le deuxième sous-clade comprend *S. niger niger* et *S. niger bilineatus*. Les données moléculaires (basées sur la datation moléculaire), écologiques et morphologiques suggèrent l'élévation des sous espèces de *S. niger* au rang d'espèces. Les distances génétiques enregistrées entre les différentes espèces ne sont pas un critère suffisant pour délimiter les espèces. En effet, les travaux de Meier *et al.* (2006) montrent, pour le gène mitochondrial COI, l'existence d'un chevauchement dans la variabilité interspécifique et intraspécifique de l'ordre de 0 à 15.5%. Ainsi, les données moléculaires, morphologiques, comportementales, et d'hybridation...doivent être combinées pour définir les limites d'espèces.

Enfin le dernier sous-clade formé par *S. calcitrans*, *S. sitiens* et *S. bengalensis*, espèces morphologiquement très similaires et décrites en milieux anthropisés.

Avec l'aide de méthodes phylogénétiques, l'hypothèse de l'horloge moléculaire nous a permis de dater les événements de spéciation des stomoxes. Ainsi, l'émergence du genre *Stomoxys* aurait eu lieu probablement fin Oligocène, il y a environ 30 million d'années, avec des événements de migrations entre l'Afrique et l'Asie

Chapitre III :
Phylogéographie de *Stomoxys calcitrans*

Ce chapitre III sera consacré à l'étude des processus gouvernant la distribution géographique de l'espèce cosmopolite *Stomoxys calcitrans*. Dans une approche intégrative faisant appel à différentes disciplines micro et macro - évolutionnaires, la phylogéographie vient nous renseigner sur la distribution des différentes lignées généalogiques. L'analyse et l'interprétation de cette distribution requièrent des données à partir de la génétique moléculaire, la génétique des populations, l'éthologie, la démographie, la phylogénie, la paléontologie, la géologie et la géographie historique (Avisé, 2000).



Phylogeography lies at a critical juncture among several well-established field (Avisé, 2000).

Le but de ce travail est donc de déduire les processus historiques ayant mené à la structuration génétique et géographique actuelle de *S. calcitrans*.

Article 2

Global population structure of the stable fly (*Stomoxys calcitrans*) inferred by mitochondrial and nuclear sequence data

(En préparation)

Global population structure of the stable fly (*Stomoxys calcitrans*) inferred by mitochondrial and nuclear sequence data

N. Dsouli-Aymes¹, J. Michaux², E. De Stordeur¹, A. Couloux³, M. Veuille⁴ and G. Duvallet¹

¹ Centre d'Ecologie fonctionnelle et évolutive UMR 5175 CEFE, Université Montpellier 3, Montpellier, France.

² Centre de Biologie et de Gestion des Populations, Montpellier, France

³ Centre National de Séquençage, Evry cedex, France

⁴ Biologie Intégrative des Populations, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France

Correspondence: Najla Dsouli-Aymes, Centre d'Ecologie fonctionnelle et évolutive (UMR 5175 CEFE), Université Montpellier 3, Route de Mende, 34199 Montpellier Cedex 5, France.

E-mail : dsouli2005@yahoo.fr

Introduction

Phylogeography studies have been intensively employed to investigate the genetic diversity of natural populations of both plants and animals. It generally aims to understand genetic diversity in connection with dispersal history (Avice, 2000). Molecular phylogeography techniques have been more frequently used in the areas of ecology, conservation genetics and biogeography. Phylogeographic papers, dealing with patterns of genetic diversity in harmful species, has undergone substantial explosion, especially for insects which are sources of economic and medical nuisance (Dusfour *et al.*, 2007; Matthews *et al.*, 2007; Pramual *et al.*, 2005). Molecular phylogeographic approaches are necessary to develop the appropriate control methods against pest like mosquitoes, ticks or hematophagous flies.

Stomoxys calcitrans, commonly called stable fly or dog fly, (Diptera, Muscidae, Stomoxyini), a synanthropic fly, is recognized to have an important medical and veterinary impact. They may visit many different food sources and may become a source of serious nuisance. Stable flies cause important economic losses by their direct pathogenic effects: a loss of weight, milk production and immunizing defences (Bruce & Decker, 1958; Miller *et al.*, 1973; Campbell *et al.*, 1977, 2001; Wieman *et al.*, 1992) and also by their role in the mechanical pathogenic transmission of virus, bacteria, protozoa and helminths (Zumt, 1973; Foil *et al.*, 1983; Freitas & Romero, 1991; D'Amico *et al.*, 1996; Foil & Gorham, 2000). Stable flies are found essentially in

rural areas near stables, slaughter houses, cattle markets and the rubbish dumps, locations related mainly to the presence of fermenting organic material (Batista *et al.*, 2005; Eesa & El-Sibae, 1993).

The stable fly is a multivoltine species; the generation time over the year is principally dependent on temperatures. Extreme temperatures appeared to reduce the duration of egg production (Lysyk, 1998). Ecological evidence suggests that stable flies are strongly vagile, dispersing far and wide (Eddy *et al.*, 1962). These flies have great capacities of flight and certain studies (Bailey *et al.*, 1979; Hogsette *et al.*, 1987) mention surprising displacement distances (several hundred kilometers), in search of a blood meal. Hogsette *et al.* (1987) showed that *S. calcitrans* can cross 5 km or more in order to find a blood meal. Marked flies were found 100 km far of their marking place and even up to 225 km after a storm (Foil & Hogsette, 1994).

Several studies, at the regional scale, indicate an important gene flow between populations of *S. calcitrans* despite the natural geographic barriers (Gilles *et al.*, 2007; Dsouli-Aymes *et al.*, 2009). Jones *et al.* (1991), Krafur (1993) and Szalanski *et al.* (1996) showed a low differentiation among *S. calcitrans* populations in the United States. Recently, Marquez *et al.* (2007) published the first and the unique work on stable fly phylogeography using mitochondrial DNA COI (550 bp) and r16S DNA (300bp). They focused their effort to explain the geographic origin of New World *Stomoxys* populations, and concluded that the most parsimonious scenario is that New World flies had Palearctic origins within the past 500 years. However, Marquez *et al.* (2007) did not discuss about the Old World dispersal history.

Our present study is based on the widest geographical sampling, consisting of 20 populations representing five major zoogeographic regions of the world. We examine mitochondrial (COI, Cyt-b and ND1-16S) and nuclear (internal transcribed spacer regions of the 18S-26S ribosomal RNA genes (ITS2)) DNA.

The aim of this work is to analyze pattern of genetic diversity and genealogical relationships among *S. calcitrans* from different zoogeographic regions, to discuss the role of historical processes in shaping the population genetic structure and status and to retrace its colonization pattern all over the world.

Materials and methods

The specimens used in this study were provided by numerous collaborators and were collected from the localities shown in Fig. 1. Voucher specimens are deposited at Laboratoire de Zoogeographie (Université Paul Valéry, Montpellier, France).

DNA extraction DNA amplification and sequencing.

Specimens were preserved at room temperature in 95% ethanol. Genomic DNA was extracted using the DNeasy tissue Kit (QIAGEN) to a final volume of 180 µl. Primers sequences for mtDNA were defined according to Simon *et al.* (1994; 2006): TL2-N-3014(TCCATTGCACTAATCTGCCATATTA) and *CI-J-2183* (CAACATTTATTTTGA TTTTTTGG) for COI; CB-J10933 (GTTTTACCTTGAGGACAAATATC) and CB-N11526 (TTCAACTGGTCGAGCTCCAATTCA) for Cytb; N1-N12261 (AACTTCATAAGAAA TAGTTTGAGC) and LR-N13000 (TACTTTAGGGATAACAGCGTAA) for ND1-16S. Primers sequences for ITS2 were defined according to Sharpe *et al.* (2000): ITS2A (TGTGAACTGCAGGACACAT) and ITS2B (TATGCTTAAATTCAGGGGGT). Standard protocols were used for all PCR amplifications. They were performed in a 30µl reaction volume containing, in final concentrations, 200 µM dNTPs (diNucleotide Tri Phosphate), 10 x buffers, 25µM of each primers, 0.5µl Taq polymerase (Eurogentec Red GoldStar®), and 3 µl of 180µl total volume of DNA solution extraction. Thermal cycling conditions were initial denaturation at 94°C for 4min, 35 cycles of denaturation at 94°C for 40 s, annealing at 48-50°C for COI, 57-58°C for Cyt-b, 53-54°C for ND1-16S and 60-62°C for ITS2, and extension at 72°C for 1 min. An elongation step at 72°C for 10 min completed the DNA amplification. One to ten specimens for each species were sequenced at GENOSCOPE, Evry, France.

-Relation among haplotypes relationships

Sequences from COI, Cyt-b, ND1-16S and ITS2 were aligned using the multiple alignment program ClustalW 1.4 (Thompson *et al.*, 1994) implemented in BioEdit (Hall, 1999). Sequence alignment was adjusted by visual inspection, taking sequences of *S. calcitrans* available in GenBank.

All phylogenetic analyses were performed for separate genes and combined protein coding mitochondrial genes (COI and Cyt-b). *Musca domestica* (Diptera, Muscidae, Muscini) and *Haematobia irritans* (Diptera, Muscidae, Stomoxyini) were selected as outgroups, for phylogenetic construction.

The best-fit model of DNA evolution was selected by comparing log-Likelihood scores of 56 model of base substitutions using the program Model test (Posada & Crandall, 1998) using PAUP4.0b10 (Swofford, 2002). Maximum likelihood (ML) was conducted within PHYML v2.1b1 (Guidon & Gascuel, 2003), based on the selected model. Nodal support was evaluated by 1000 bootstrap replicates.

A minimum spanning network among haplotypes was computed from the matrix of pairwise distance calculated among all pairs of haplotypes, using Arlequin v 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005).

-Population genetic structure

To assess population's subdivision, we performed an analysis of molecular variance (AMOVA) between zoogeographic regions, available in Arlequin v 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005). Population pairwise F_{st} was also calculated using Arlequin v 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005) according to the best model of substitution. Furthermore, Sequences distances values were conducted using the Kimura 2-parameter (K2P) method in MEGA4 (Tamura *et al.*, 2004; 2007).

-Demographic trends

Evaluation of haplotype number and estimation of haplotype diversity (h), as well as nucleotide diversity (π) associated with their respective standard divergence (SD), were performed using DNAsp v 4.10.9 (Rozas *et al.*, 2003).

Mismatch distribution analysis was used to investigate indications for demographic expansions using DNAsp v 4.10.9 (Rozas *et al.*, 2003). The demographic history of the populations was inferred using two of the most powerful tests of population expansion: Fu's F_s (Fu, 1997) and Ramos-Onsins & Rozas R_2 statistics (Ramos-Onsins & Rozas, 2002), using DNAsp v. 4.10.9 (Rozas *et al.*, 2003). Recent population expansions are expected to be associated with low values of this parameter.

Furthermore, expansions parameters Theta Initial (theta before the population Growth or Decline) and τ (Tau) was calculated by letting Theta Final as infinite. Subsequently, we estimated the time since the most recent expansion (t) from the mismatch distribution parameter τ using the equation $\tau = 2ut$ (Rogers & Harpending, 1992), where u is the mutation rate per sequence and per generation ($u = m_T\mu$ where m_T is the number of nucleotides of the sequences under study and μ is the mutation rate per nucleotide). The *Drosophila* mutation rate of 10^{-8} /site/year (DeSalle *et al.*, 1987) and 10 generations per year of *S. calcitrans* were used in this calculation.

Results

-Mitochondrial data

For COI, Cyt-b and ND1-16S, 753 bp, 526 bp and 568 bp were analyzed respectively, from 20 localities spanning different zoogeographic regions. The GTR (General Time reversible) + G (gamma distribution shape parameter) model provided the best model of DNA substitution (lnL=-3043.54), for combined COI and Cyt-b. Parameter estimates were 0.3192 (A), 0.1382 (C), 0.1295 (G) and 0.4131 (T) for base frequencies and $G = 0.162$. Phylogenetic tree reconstruction

illustrates two lineages clades: the first clade consisting of Indian and Thailand populations and the second clade including all the remaining populations from five zoogeographic regions. ML method exhibit a great bootstrap value (BP = 100), separating Oriental from remaining haplotypes (Fig. 2).

The minimum spanning network for separate COI, Cyt-b and ND1-16S confirm that the Oriental lineage is clearly differentiated from the other groups by 13, 6 and 9 mutational steps for COI, Cyt-b and ND1-16S, respectively; while haplotypes from the residual regions are assorted together (Fig. 4).

Distribution of shared haplotypes is listed in Table 1. The Oriental region does not share any haplotypes with the other regions. Majority of the New World haplotypes are common either with Palearctic or Afrotropical regions. Note that mtDNA data didn't record any common haplotypes between Palearctic and Afrotropical regions.

Genetic differentiation among lines from Oriental and remaining zoogeographic region was tested using AMOVA (Table 2). AMOVA tested among two groups, indicates that COI, Cyt-b and ND1-16S diversity account for 81.65%, 66.43% and 82.28% respectively. Whereas, 9.08% (COI), 17.14% (Cyt-b) and 6.44% (ND1-16S) of variation occurring among populations within remaining zoogeographic regions.

Populations pairwise F_{st} and genetic divergence among major zoogeographic regions are given respectively in Table 3 and 4. Great pairwise populations F_{st} differentiating Oriental regions from the others was recorded, however little value was attested between Nearctic and Oceania.

Haplotypes and nucleotides diversities are indicated in Table 6 and 7. Results demonstrate that highest nucleotide diversities are recorded roughly in Oriental and Afrotropical regions. Fu's F overall samples was -5.772, -8.330 and -12.919 for COI, Cyt-b and ND1-16S respectively. R_2 within each country varied from 0.1 to 0.5.

By combining the two protein coding mitochondrial genes (COI and Cyt-b) we obtained 1279 bp, from 59 individuals, of which 41 were informative. 43 haplotypes were found, of which 2 were shared between Palearctic and American regions. Expansion parameters Theta and Tau of major zoogeographic regions are indicated in Table 5. The mismatch distribution of Oriental, Afrotropical and Palearctic regions is shown in Fig. 5. A signature of population expansion is indicated in all three populations during late Pleistocene and Holocene.

-ITS 2 data

The best model for ITS2 ribotypes was F81 (Felsenstein 81) + G, ($G = 0.360$). However, no deep phylogenetic relationships were resolved in the Maximum Likelihood tree (Fig. 3). The oriental

lineage is however separated to the other groups but with a weak support (Bootstrap value, lower than 50%).

On the 25 founded ribotypes, only one was shared between all zoogeographic regions, except for the Oriental population. All other ribotypes were unique to their geographical locations. Overall, nucleotide diversity was low = 0.00493 ± 0.0007 and Fu's F was very negative attesting a recent population expansion. Network analysis show fewer mutational steps between groups and display a star like pattern, where the most common ribotypes lie at the star's center and derivatives are connected to them independently by short branches. The Oriental lineage is separated from the others by only 2 mutational steps (Fig. 4).

Discussion

Populations Pairwise F_{st} , ML and networks analyses, carried out with both mitochondrial and nuclear data, clearly show that the populations from the Oriental region (first lineage), are well separated and differentiated from the remaining populations (second lineage) (Afrotropical, Palearctic, Nearctic, Neotropical and Oceania). The AMOVA analyses confirm this geographic structure by displaying a great mitochondrial variation between the two groups. In contrast, a weak geographic structure was detected between the remaining zoogeographic regions. A similar pattern was observed by Cummings *et al.* (2005) for the face flies, as they detect an enormous genetic differentiation between Kazakh and other face flies, suggesting the existence of a species complex.

The COI genetic distances measured between the 2 stable fly groups (K2P \approx 2%) was higher than the distance found within each of them (K2P is about 0.2% within the first group and it varies from 0.2% to 0.5% within the second group). In comparison, the genetic distances recorded in our previous study among the different species of the *Stomoxys* genus, varied from 5.1% to 24% for COI (Dsouli-Aymes *et al.*, in preparation).

We are well aware that the use of DNA sequences for species delimitation is widely criticized (Tautz *et al.*, 2002; DeSalle *et al.*, 2005; Meier *et al.*, 2006), particularly for the arthropods. For example, by using 600 bp of COI, Meier *et al.* (2006) recorded an interval overlap between intraspecific and interspecific diptera variability corresponding to 0.84 - 5.14%. However, there is no doubt that the Oriental populations are differentiated from the others and according to our data, we can hypothesize that the two observed stable fly lineages would rather correspond to two subspecies than to different species or species complex.

The strong geographic structure could be explained by the isolation of two *S. calcitrans* groups in two different refuges during the Quaternary. The nucleotide diversity analysis (Table 6 and 7) shows a greater value in the Afrotropical populations as compared to the Palearctic and New world ones. This result would suggest that Africa would correspond to a refuge from where this species recolonised the other regions at the exception of the Oriental ones. Another refuge not yet precisely localized would have also existed in this last region. However, recolonisations from this refuge appeared to be less developed and were limited to the oriental region. This could be probably linked to the presence of strong biogeographic barriers (Himalaya mountains, deserts...) existing around this geographic zone. Another reason to explain this isolation, would be that *S. calcitrans* was already established in Eastern Asia for a long time and that they would have prevented the colonization of new invaders. Indeed, when populations have filled the space, it is generally much more difficult for those behind them to colonise, because they must disperse and reproduce logistically and not exponentially like the original scattered colonists (Hewitt, 2000). New sampling from additional Oriental population would be interesting to localize the origin refuge in this region.

Genetic distances recorded in this study between the two major lineages range from 1.8 to 2.3%. Assuming a mitochondrial divergence rate of 2% per myr (DeSalle *et al.*, 1987), we can estimate a separation between them in the order of 1.15 to 0.9 million years ago (mya), corresponding to the middle Pleistocene period.

For all mitochondrial DNA data set, no haplotypes were shared between African and Palearctic region suggesting a old separation between populations from these two regions. Only the ITS2 gene shows one ribotype shared between the Afrotropical and the Palearctic. However, as the nuclear gene generally evolves more slowly than mitochondrial genes (Avise, 2000), this common sequences would represent a past common history between populations from these two biogeographic regions.

Comparing data from these two regions, we also note low nucleotide diversities for the Palearctic populations, suggesting a bottleneck effect for them.

Therefore, our results would suggest an ancient colonization of the Palearctic from the Afrotropical region followed by a subsequent long isolation among them. According to paleoclimatological data, migratory flow was probably possible and more favored for this species until the early Pleistocene. Later, during the Quaternary glaciations, the tropic conditions were colder and drier, extending deserts and savannah while reducing rain forests (Swezey, 2001). By the late Pleistocene, the Sahara became arid. All these conditions led probably to decrease the number of migrants that was able to reach the Palearctic from Africa. This restraint was probably reinforced by other geographic barriers, such as the Mediterranean sea and the

Atlas in North Africa, which played and probably still play an important role for decreasing gene flow among these two regions.

According to Brues (1913), new world *S. calcitrans* has a Palearctic origin. In 2007, Marquez *et al.* confirmed this origin. They also proposed that this introduction occurred after the Christopher Columbus exploration, within the past 500 years. Unfortunately, our sampling does not enable to confirm or to disapprove the introduction age of *S. calcitrans* in America. Nevertheless, we are in agreement with this dating and we find it suitable. However, our results suggest that a Palearctic origin would not be the unique alternative, an Afrotropical origin being credible too. Indeed, the haplotype distributions among the zoogeographic regions tend to propose that the New World was colonized independently by the two areas (existence of common haplotypes between the New World populations and the Afrotropical region which were not retrieved in the Palearctic populations). However, this hypothesis should be verified by the analysis of a greater sampling from the Palearctic region. If yes, this hypothesis is confirmed, this multiple inoculation would explain the relative unexpected high values of nucleotide diversities found in the New World populations, especially for the COI and the Cyt-b. Thus, the European colonization of America probably pointed out the *S. calcitrans* immigration beginning, from the Palearctic. Later, other successive waves of immigration would have appeared, notably from the African continent. Indeed, transatlantic slave trades, which occurred principally between the American and the African continent, would have emphasized the *S. calcitrans* inoculation to the New World. More generally, Commercial exchanges globalization has probably allowed the dispersion of *S. calcitrans* all over the world, in particular in the Pacific region, like in New Caledonia. As suggested by the surprisingly high level of genetic diversity in this island, the recent *S. calcitrans* introduction to New Caledonia was certainly multiple and continuous and would have been associated to the recurrent introduction of *Bos taurus* European breeds in the tropical belt.

The low diversity in cold regions might be explained by the annual overwintering process. So the longer the winter, the greater the expected effects of genetic drift (Krafsur *et al.*, 2005). This annual reduction in population size constitutes an annual population bottleneck. Berford & Sutcliffe (2009) showed that Stable fly populations in Canada, first occur in late spring, grow exponentially throughout the summer, and are frozen back each autumn. So, residual Populations disperse from local climatic overwintering refugia and colonize neighboring farms.

Evidences from the mismatch distributions analysis indicate that Oriental, Afrotropical and Palearctic regions have undergone a population expansion. We didn't use mismatch distribution to test expansion for Nearctic, Neotropical and Oceania region due to a too weak sampling size. The time to expansion for *S. calcitrans* in the Oriental, Afrotropical and Palearctic regions is approximately 15 496, 11 469 and 6 419 years ago, respectively.

The recent expansion of *S. calcitrans* is probably associated to last glacial period, especially to the Würm glaciation. Stable fly expansion could also have been influenced by the significant continental human expansions that are estimated to have begun between 70 000 and 50 000 years ago (Rogers & Harpending, 1992). Human populations change from nomadic hunter gather societies to more sedentary agricultural population centers. Therefore, the most widely accepted view that domestication occurred from 18 000 to 8 000 years ago (Hamblin & Veuille, 1999). *S. calcitrans* expansion is may be strongly related to the dog domestication, which would have occurred in East Asia around 15 000 years ago (Savolainen *et al.*, 2002).

Similarly, David & Capy (1988) proposed a colonization history of *D. melanogaster*, starting with an expansion from Africa to Europe and Asia approximately 10 000 to 15 000 years ago. Recent expansions in a variety of disease vectors, including anophelinae (Donnelly *et al.*, 2001; Dusfour *et al.*, 2007; Matthews *et al.*, 2007), and black flies (Pramual *et al.*, 2005) appear to be tied to human population expansions and/ or to climate changes and to the rise of agriculture, providing significant new breeding sites and sources of bloodmeals (Coluzzi *et al.*, 1982). Domestication seems to be key for the establishment of *S. calcitrans* expansion process. An exhaustive study for each region is requested for better demographic history comprehension.

Acknowledgments

We thank Jacques-François Mavoungou (Gabon), Roundthip Masmethathip (Thailand), Alekaw Sinshaw Tegegne (Ethiopia), Dr. Nicolas Barre (samples from New-Caledonia), Dr. Cambell (samples from Canada), Dr. J. Depaquit (samples from Montenegro), Dr. J. Gilles (samples from Madagascar, La Réunion, Mayotte), Dr. P. Grimaud (samples from Uganda), Dr.J. Bouyer (samples from Burkina Faso) and Dr. D. Cuisance (samples from Cameroun) for providing some *Stomoxys* samples. We extend our thanks to Gwenaëlle Mondor (CBGP) for technical assistance. This study was partially supported by Agence Nationale de la Recherche through the ANR-Biodiv grant IFORA (Iles Forestières Africaines) to Michel Veuille, and by the CNS-Genoscope "Barcoding insects for identification" sequencing grant to Michel Veuille.

Figure 1. *S. calcitrans* sampling locations

Region	Country	COI	Cyt-b	ND1-16S	ITS2
Oriental	India	2	2	2	1
	Thailand	9	9	11	12
Afrotropical	Ethiopia	6	4	6	3
	Uganda	1	2	2	2
	Gabon	8	6	5	3
	Cameroun	3	8	4	9
	Senegal	6	2	6	5
	Burkina Faso	1	3	1	0
	Madagascar	2	2	1	2
	La Reunion	2	1	2	4
	Anjouan	5	5	5	4
	Mayotte	1	1	1	1
Palaearctic	Tunisia	3	5	5	3
	Algeria	3	4	3	3
	Morocco	6	4	5	3
	France	5	6	9	3
	Montenegro	1	1	1	1
Nearctic	Canada	7	4	11	7
Neotropical	Colombia	6	7	7	5
Oceania	N. Caledonia	4	5	4	4
Total	20 pop	80	81	91	75

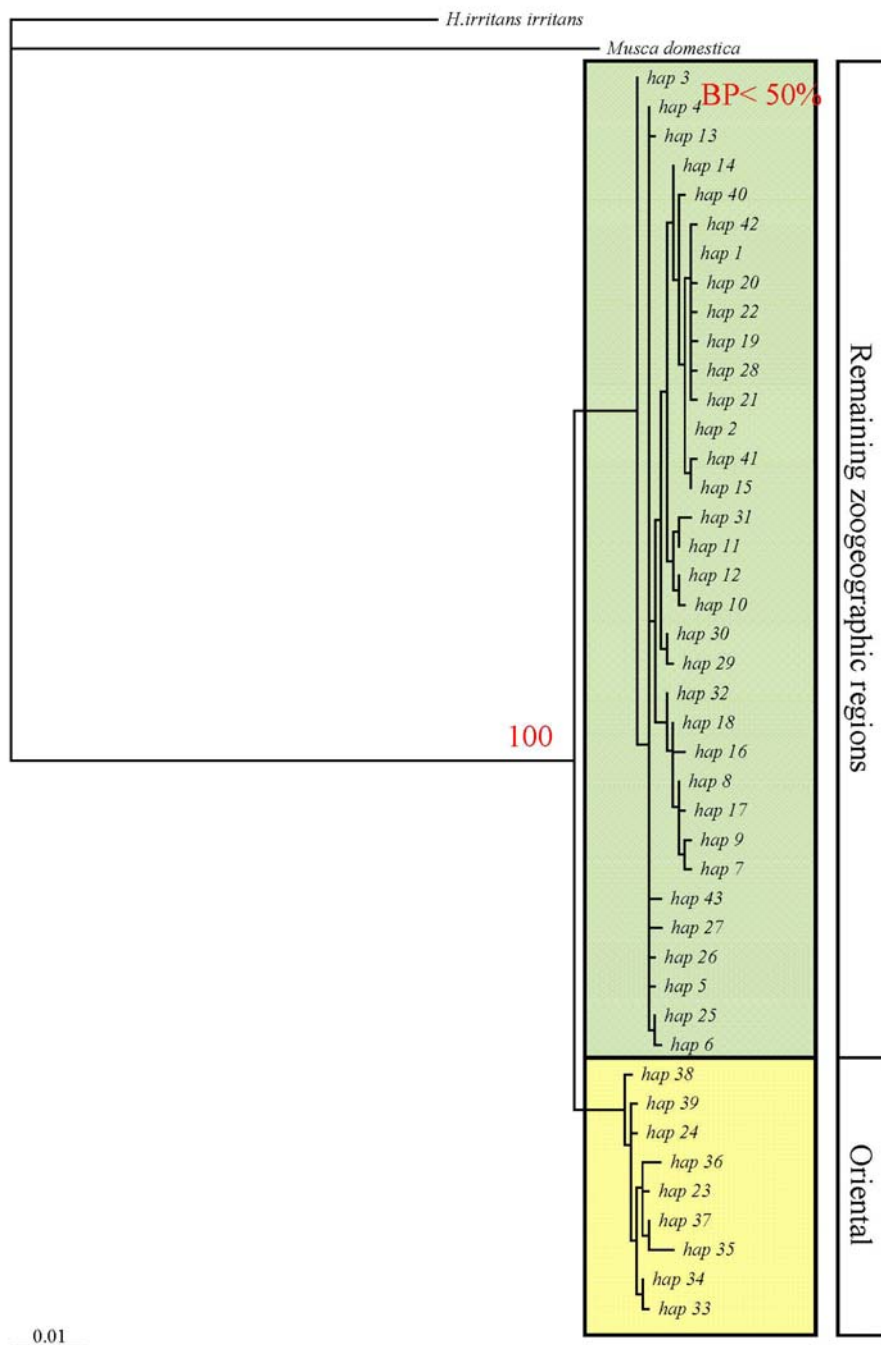


Figure 1. Maximum Likelihood tree for Combined COI and Cyt-b haplotypes. Numbers correspond to the Bootstrap Probability (BP) above 50%.

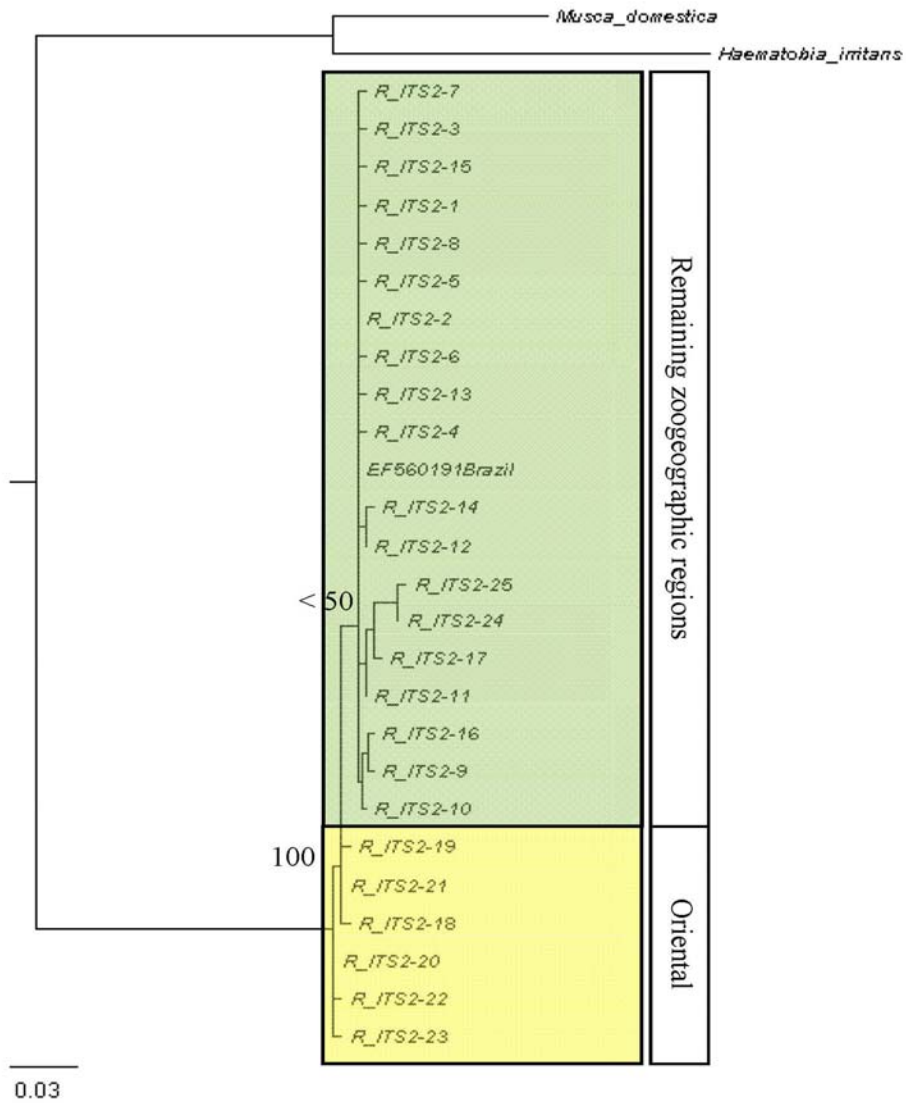


Figure 2. Maximum Likelihood tree for ITS2 ribotypes. Numbers correspond to the Bootstrap Probability (BP) above 50%.

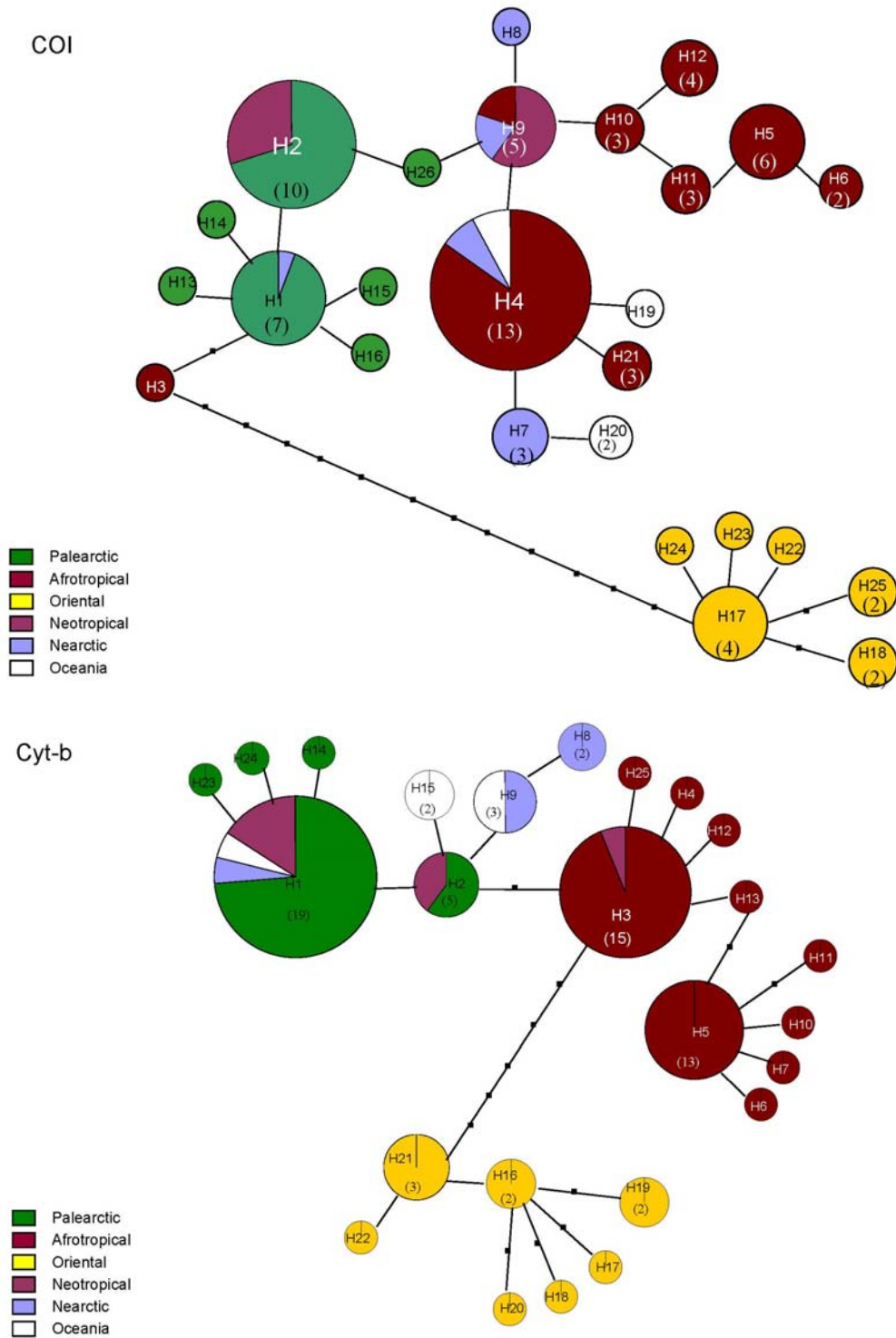


Figure 3. Minimum spanning network of haplotypes from mtDNA and of ribotypes ITS2, implemented in Arlequin v 3.0. Circles represent haplotypes with size being equivalent to frequency. Lines and full circles indicate mutational steps between haplotypes and N = 1 if not otherwise specified.

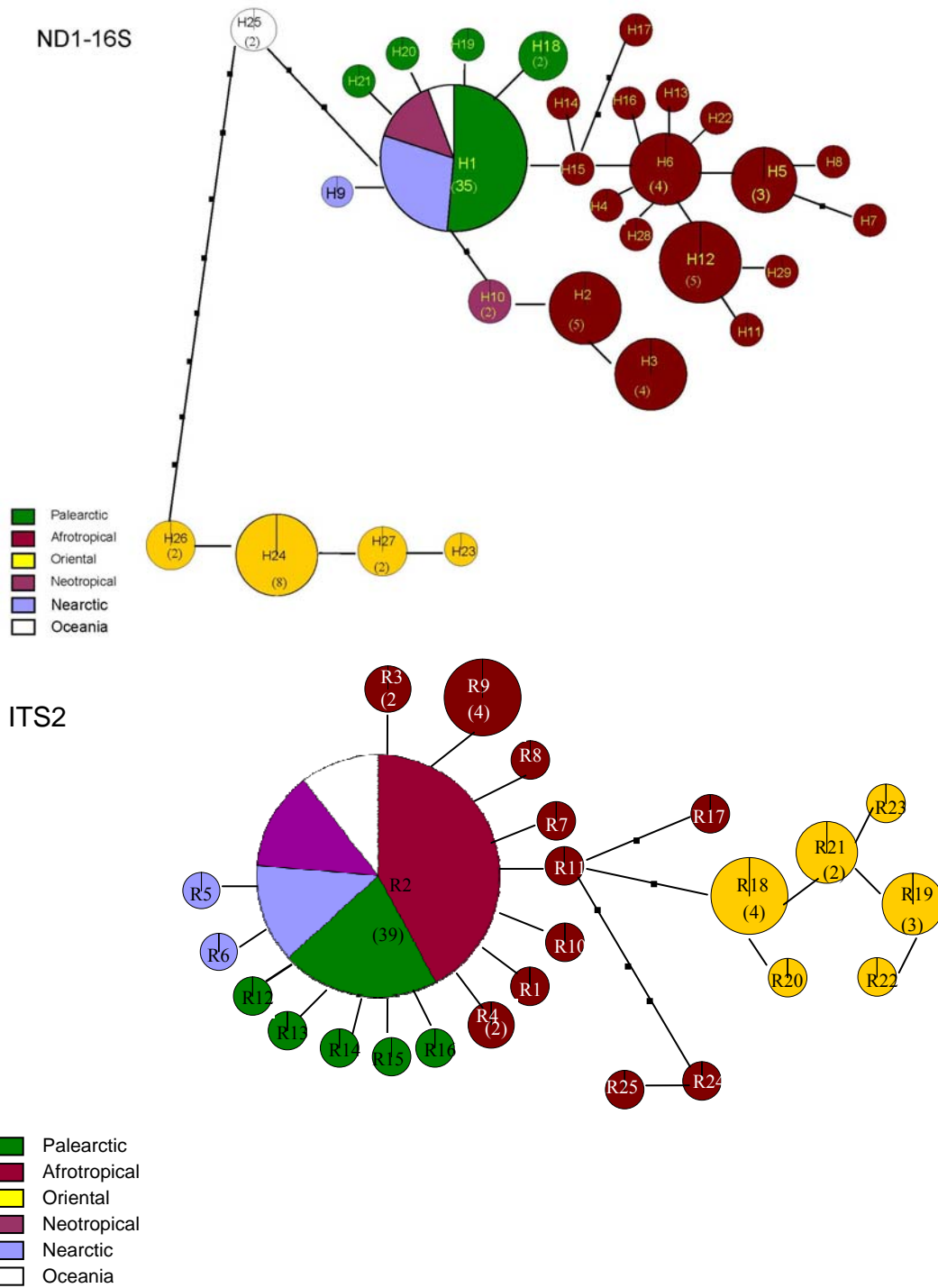


Figure 3. (Continuation). Minimum spanning network of haplotypes from mtDNA and of ribotypes ITS2, implemented in Arlequin v 3.0. Circles represent haplotypes with size being equivalent to frequency. Lines and full circles indicate mutational steps between haplotypes and N = 1 if not otherwise specified.

Table 2. Distribution of shared haplotypes of *S.calcitrans* among zoogeographic regions. N = numbers of sequences.

	Haplotypes n°	Afrotropical	Palaearctic	Oriental	Nearctic	Neotropical	Oceania	
COI	Hap_COI1		6		1			
	Hap_COI2		7			3		
	Hap_COI4	11			1		1	
	Hap_COI9	1			1	3		
	Prop. singleton	0.77	0.71	1	0.4	0/2	0.66	
	Total Hap/N	9/34	7/18	6/11	5/7	2/6	3/4	26/80
Cyt-b	Hap_Cytb1		14		1	3	1	
	Hap_Cytb2		3			2		
	Hap_Cytb3	13				2		
	Hap_Cytb9				1		2	
	Prop. singleton	0.8	0.6	1	0.33	0	0.33	
	Total Hap/N	10/34	5/20	7/11	3/4	3/7	3/5	24/81
ND1-16S	Hap_ND1-16S1		18		10	5	2	
	Prop. singleton	1	0.8	1	0.5	0.5	0.5	
	Total Hap/N	17/33	5/23	4/13	2/11	2/7	2/4	29/91
ITS2	Rib ITS2-2	17	8		5	5	4	
	Prop. singleton	0.91	0.83	1	0.5	0	0	
	Total Rib/N	12/33	6/13	6/13	2/7	1/5	1/4	25/75

Table 3. AMOVA results for the genetic differentiation among *S. calcitrans* populations between and within continents groups based on COI / Cytb / ND1-16S.

Source of variation	d.f	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among groups	1 / 1 / 1	138.350 / 71.038 / 133.289	6.750 Va / 3.149 Va / 5.658 Va	81.65 / 66.43 / 82.28
Among populations within groups	4 / 4 / 4	37.675 / 41.116 / 27.413	0.750 Vb / 0.816 Vb / 0.443 Vb	9.08 / 17.14 / 6.44
Within populations	74 / 75 / 85	56.712 / 59.636 / 65.946	0.766 Vc / 0.795 Vc / 0.775 Vc	9.27 / 16.70 / 11.28
Total	79 / 80 / 90	232.738 / 171.790 / 22.648	8.269 / 4.760 / 6.877	
Fst	0.907 / 0.832 / 0.887			

Table 4. *S. calcitrans* Population pairwise F_{st} , among zoogeographic regions. (a) Values for Cytb (lower) and COI (upper). (b) Values for ND1-16S (lower) and ITS2 (upper).

(a)

	Oriental	Afrotropical	Palaearctic	Nearctic	Neotropical	Oceania
Oriental	-	0.897	0.917	0.896	0.906	0.891
Afrotropical	0.782	-	0.594	0.286	0.450	0.308
Palaearctic	0.894	0.619	-	0.570	0.368	0.675
Nearctic	0.790	0.488	0.597	-	0.378	0.060
Neotropical	0.800	0.356	0.243	0.307	-	0.550
Oceania	0.800	0.491	0.459	0.093	0.145	-

(b)

	Oriental	Afrotropical	Palaearctic	Nearctic	Neotropical	Oceania
Oriental	-	0.586	0.667	0.672	0.681	0.663
Afrotropical	0.789	-	0.017	-0.004	-0.067	-0.098
Palaearctic	0.929	0.385	-	0.002	-0.074	-0.109
Nearctic	0.942	0.333	0.012	-	-0.056	-1.098
Neotropical	0.903	0.252	0.168	0.199	-	0.0000
Oceania	0.852	0.293	0.475	0.522	0.221	-

Table 5. *S. calcitrans* genetic distance in % (K2P) among zoogeographic regions inferred by Cyt-b (lower) and COI (upper).

	Oriental	Afrotropical	Palaearctic	Nearctic	Neotropical	Oceania
Oriental	-	2.3	2.2	2.3	2.3	2.2
Afrotropical	1.8	-	0.5	0.3	0.4	0.3
Palaearctic	2	0.7	-	0.4	0.2	0.5
Nearctic	1.9	0.7	0.4	-	0.3	0.2
Neotropical	1.8	0.5	0.2	0.4	-	0.4
Oceania	1.9	0.7	0.3	0.3	0.3	-

Table 6. Estimated parameters of *S. calcitrans* population expansion.

Sample	Theta initial	Tau	Time since expansion
Oriental	0	3.964	15 496
Afrotropical	1.218	2.934	11 469
Palaearctic	0	1.642	6 419

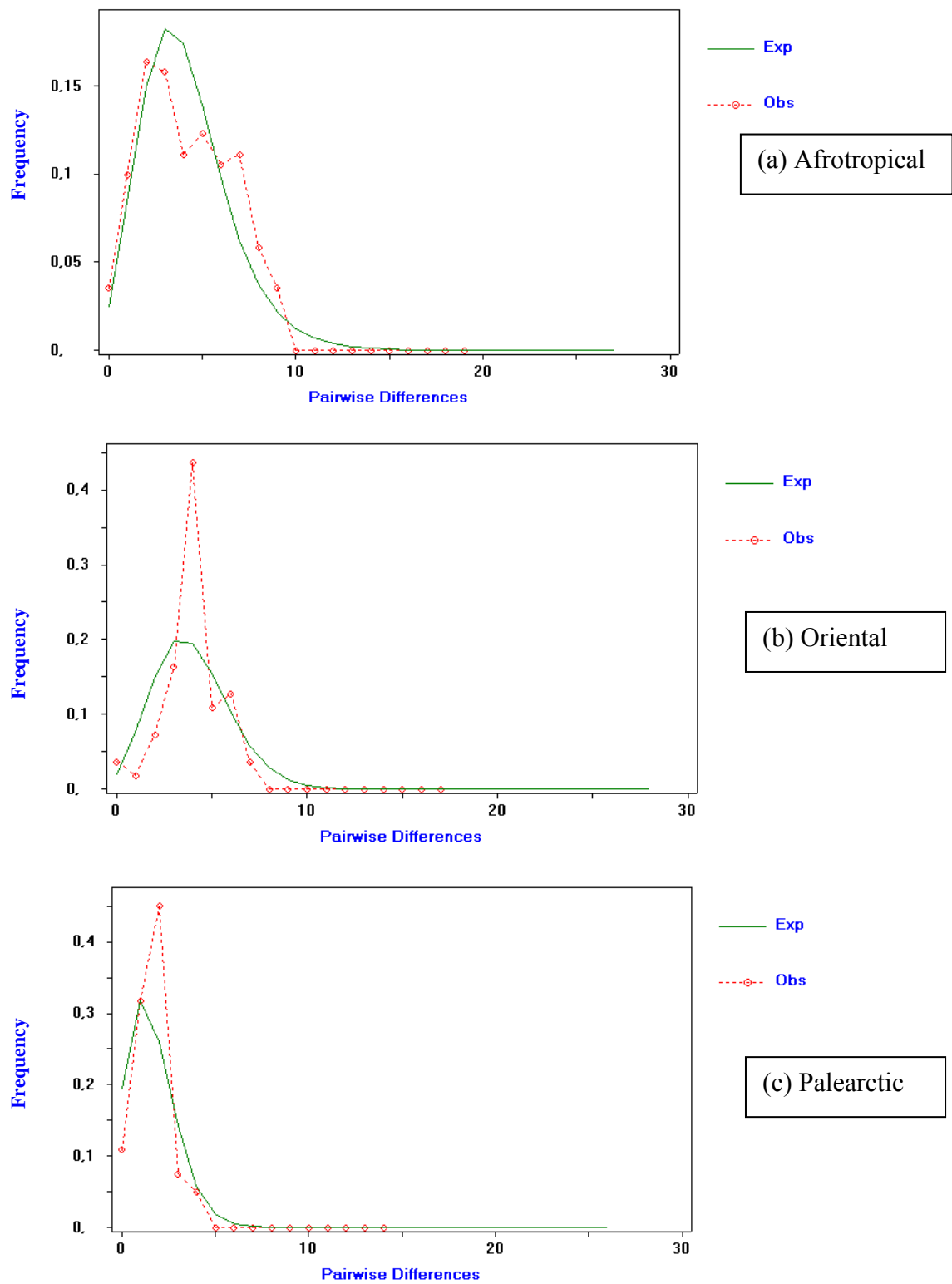


Figure 4. Mismatch distribution of the (a) Afrotropical (b) Oriental and (c) Palearctic population groups.

Table 7. Genetic indices for all populations COI (I) and Cyt-b (II). Sample size in parentheses. Summary of haplotype number (hap), haplotype diversity (H), mean nucleotide diversity (π), Ramos-Onsins and Rosas ($R2$) and Fu's F .

	N		hap		H (sd)		π (sd)		R2		Fu's F	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
<u>Oriental</u>	11	11	6	7	0.855 (0.085)	0.909 (0.066)	0.00237 (0.00046)	0.00415 (0.00059)	0.152	0.124	-1.867	-2.601
India	2	2	2	2	1.000 (0.500)	1.000 (0.500)	0.00133 (0.00066)	0.00570 (0.00285)	0.500	0.500		
Thailand	9	9	6	6	0.888 (0.091)	0.916 (0.073)	0.00258 (0.00049)	0.00412 (0.00065)	0.153	0.147		
<u>Aftrotropical</u>	34	34	9	10	0.847 (0.040)	0.722 (0.054)	0.00226 (0.00022)	0.00383 (0.00032)	0.122	0.083	-2.551	-2.787
Ethiopia	6	4	4	2	0.866 (0.129)	0.500 (0.265)	0.00159 (0.00037)	0.00095 (0.00050)	0.180	0.433		
Uganda	1	2	1	2	-	1.000 (0.500)	-	0.00760 (0.00380)	-	0.500	-	
Gabon	8	6	5	2	0.857 (0.108)	0.333 (0.215)	0.00185 (0.00035)	0.00127 (0.00082)	0.230	0.372		
Cameroun	3	8	2	8	0.666 (0.310)	0.642 (0.184)	0.00089 (0.00042)	0.00401 (0.00103)	0.470	0.1826		
Senegal	5	2	3	1	0.700 (0.218)	0	0.00212 (0.00066)	0	0.240	-		-
Burkina Faso	1	3	1	2	-	0.666 (0.314)	-	0.00380 (0.00179)	-	0.471		
Madagascar	2	2	2	2	1.000 (0.500)	1.000 (0.500)	0.00133 (0.00066)	0.00190 (0.00095)	0.500	0.500		
Réunion island	2	1	2	1	1.000 (0.500)	-	0.00133 (0.00066)	-	0.500	-		-
Anjouan	5	5	2	2	0.400 (0.234)	0.400 (0.237)	0.00106 (0.00063)	0.00076 (0.00045)	0.104	0.400		
Mayotte	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-		-
<u>Palaearctic</u>	18	20	7	5	0.765 (0.073)	0.507 (0.126)	0.00143 (0.00025)	0.00105 (0.00030)	0.0864	0.126	-3.514	-2.704
Tunisia	3	5	3	2	1.000 (0.272)	0.900 (0.161)	0.00177 (0.00059)	0.00228 (0.00055)	0.235	0.264		
Algeria	3	4	2	2	0.666 (0.650)	0.500 (0.265)	0.00089 (0.00033)	0.00095 (0.00050)	0.470	0.433		
Morocco	6	4	2	1	0.533 (0.172)	0	0.00071 (0.00023)	0	0.266	-		-
France	5	6	5	1	1.000 (0.126)	0	0.00212 (0.00041)	0	0.100	-		
Montenegro	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-		-
<u>Nearctic /Canada</u>	7	4	5	3	0.857 (0.198)	0.833 (0.222)	0.00215 (0.00059)	0.00317 (0.00011)	0.218	0.309		
<u>Neotropic /Colombia</u>	6	7	2	3	0.600 (0.283)	0.762 (0.115)	0.00159 (0.00034)	0.00290 (0.00067)	0.300	0.254		
<u>Oceania /New caledonia</u>	4	5	3	3	0.833 (0.222)	0.800 (0.164)	0.00243 (0.0007)	0.00304 (0.00062)	0.260	0.240		
Total	80	81	26	24	0.938 (0.012)	0.885 (0.020)	0.00782 (0.00106)	0.00816 (0.00080)	0.104	0.072	-5.772	-8.330

Table 8. Genetic indices for all populations ND1-16S (I) and ITS2 (II). Sample size in parentheses. Summary of haplotype number (hap), haplotype diversity (H), mean nucleotide diversity (π), Ramos-Onsins and Rosas ($R2$) and Fu's F .

	N		hap		H (sd)		π (sd)		R2		Fu's F	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Oriental	13	13	4	6	0.615 (0.136)	0.846 (0.070)	0.00145 (0.00043)	0.00381 (0.00049)	0.142	0.226	-0.940	-2.205
India	2	1	2	1	1.000 (0.500)	-	0.00355 (0.00177)	-	0.500	-	-	-
Thailand	11	12	3	6	0.581 (0.142)	0.833 (0.064)	0.00116 (0.00034)	0.00386 (0.00051)	0.163	0.229	-	-
Afrotropical	33	33	17	12	0.933 (0.022)	0.727 (0.081)	0.00527 (0.00042)	0.00430 (0.00112)	0.089	0.059	-8.928	-6.836
Ethiopia	6	3	6	3	1.000 (0.096)	1.000 (0.272)	0.00461 (0.00112)	0.00560 (0.00015)	0.149	0	-	-
Uganda	2	2	2	2	1.000 (0.500)	1.000 (0.500)	0.00355 (0.00176)	0.00280 (0.00140)	0.500	0.500	-	-
Gabon	5	3	2	2	0.400 (0.237)	0.666 (0.314)	0.00142 (0.00084)	0.00187 (0.00088)	0.400	0.471	-	-
Cameroun	4	9	4	3	1.000 (0.177)	0.555 (0.165)	0.00325 (0.00078)	0.00171 (0.00060)	0.265	0.184	-	-
Senegal	6	5	5	3	0.805 (0.120)	0.700 (0.218)	0.00236 (0.00052)	0.00392 (0.00160)	0.152	0.284	-	-
Burkina Faso	1	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Madagascar	1	2	1	2	-	1.000 (0.500)	-	0.00280 (0.00140)	-	0.500	-	-
Réunion island	2	4	1	3	-	0.833 (0.222)	-	0.00280 (0.00095)	-	0.250	-	-
Anjouan	5	4	2	2	0.400 (0.237)	0.500 (0.265)	0.00071 (0.00042)	0.00140 (0.00074)	0.400	0.433	-	-
Mayotte	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Paelearctic	23	13	5	6	0.391 (0.125)	0.641 (0.150)	0.00102 (0.00037)	0.00251 (0.00079)	0.086	0.096	-2.403	-3.489
Tunisia	5	3	1	3	-	1.000 (0.272)	-	0.00373 (0.00124)	-	0.235	-	-
Algeria	3	3	1	1	-	0	-	-	-	-	-	-
Morocco	5	3	1	3	-	1.000 (0.272)	-	0.00560 (0.00197)	-	0.272	-	-
France	9	3	5	1	0.805 (0.120)	0	0.00236 (0.00052)	-	0.152	-	-	-
Montenegro	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Nearctic /Canada	11	7	2	3	0.182 (0.144)	0.524 (0.144)	0.00032 (0.00026)	0.00160 (0.00072)	0.287	0.225	-	-
Neotropic / Colombia	7	5	2	1	0.476 (0.171)	-	0.00168 (0.00060)	-	0.238	-	-	-
Oceania /New caledonia	4	4	2	1	0.667 (0.204)	-	0.00352 (0.00108)	-	0.333	-	-	-
Total	91	75	29	25	0.885 (0.036)	0.726 (0.057)	0.00717 (0.00072)	0.00493 (0.00070)	0.068	0.040	-12.919	-22.590

References

- Awise, J.C. (2000) Phylogeography. The history and Formation of Species. *Havard University Press, Cambridge, MA*, 464 pp.
- Bailey, D.L., Whitfield, T.L. & Smittle, B.J. (1979) Flight and dispersal of the stable fly. *Journal of Economic Entomology*, **66**, 410-411.
- Batista, Z.R., Leite, R.C., Oliveira, P.R., Lopes, C.M.L. & Borges, L.M.F. (2005) Populational dynamics of *Stomoxys calcitrans* (Linneaus) (Diptera: Muscidae) in three biocenosis, Minas Gerais, Brazil. *Veterinary Parasitology*, **130**, 343-346.
- Beresford, D. V. & Sutcliffe, J. F. (2009) Local Infestation or Long-Distance Migration? The Seasonal Recolonization of Dairy Farms by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) in South Central Ontario, Canada. *Journal of Economic Entomology*, **102** (2), 788-798.
- Brues, C.T. (1913). The geographical distribution of the stable fly, *S. calcitrans*. *Journal of Economic Entomology*, **6**, 459-477.
- Bruce, W.N. & Decker, G.C. (1958) The relationship of stable fly to milk production in dairy cattle. *Journal of Economic Entomology*, **51** (3), 269-275.
- Campbell, J.B., Skoda, S.R., Berkerile, D.R., Boxler, D.J., Thomas, G.D., Adams, D.C. & Davis, R. (2001) Effects of stable flies (Diptera: Muscidae) on weight gains of grazing yearling cattle. *Journal of Economic Entomology*, **94**, 780-783.
- Campbell, J.B., White, R.G., Wright, J.E., Crookshank, R. & Clanton, D.C. (1977) Effects of stable flies (Diptera-Muscidae) on weight gains and feed-efficiency of calves on growing and finishing rations. *Journal of Economic Entomology*, **70**, 592-594.
- Coluzzi, M. (1982) Spatial distribution of chromosomal inversions and speciation in the Anopheline mosquitoes. *Progress in Clinical and Biological Research*, **96**, 143 – 153.
- Cummings, M.A., Moon, R.D. & Krafur, E.S. (2005) North American face flies old World origins: mitochondrial evidence. *Medical and veterinary Entomology*, **19**, 48-52.
- D'Amico, F., Gouteux, J.P., Le Gall, F. & Cuisance, D. (1996) Are stable fly (Diptera: Stomoxyinae) vectors of *Trypanosoma vivax* in the Central African Republic. *Veterinary Research*, **27**, 161-170.

- DeSalle, R., Egan, M.G. & Siddal, M. (2005) The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **360**, 1905-1916.
- DeSalle, R., Templeton, A., Mori, I., Pletscher, S. & Johnston, J. S. (1987) Temporal and spatial heterogeneity of mitochondrial DNA polymorphisms in natural populations of *Drosophila mercatorum*. *Genetics*, **116**, 215-223.
- Donnelly, M.J., Licht, M.C. & Lehmann, T (2001) Evidence for Recent Population Expansion in the Evolutionary History of the Malaria Vectors *Anopheles arabiensis* and *Anopheles gambiae*. *Molecular Biology and Evolution*, **18**(7), 1353–1364.
- Dsouli-Aymes, N., Mavoungou, J.F., De Stordeur, E. & Duvallet, G. (2009) Landscape, Population structure and genetic diversity of *Stomoxys calcitrans*. *Parasite*, **16**, 37-41.
- Dsouli-Aymes, N., Delsuc, F., Michaux, J., De Stordeur, E., Couloux, A., Veuille, M. & Duvallet, G. Combined mitochondrial and nuclear phylogenetic analyses suggest an Oriental origin for parasitic *Stomoxys* flies (Diptera: Muscidae). *In preparation*.
- Dusfour, I., Michaux, J.R., Harbach, R. E. & Manguin, S (2007) Speciation and Phylogeography of the Southeast Asian *Anopheles sundaicus* complex. *Infection, Genetics and Evolution*, **7**, 484-493.
- Eddy, G.H., Rooth, A.R & Plapp, F.W. (1962) Studies on the flight habitats of some marked insects. *Journal of Economic Entomology*, **55**, 603.
- Eesa, N.M., & El-Sibae, M. M. (1993) Population dynamics of some synanthropic fly species in different habitats in Buraydah, Saudi Arabia. *Journal of the Egyptian of parasitology*, **23** (1), 133-40.
- Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**, 47-50.
- Foil, L.D. & Gorham, J.R. (2000) Mechanical transmission of disease agents by arthropods. *In: B.F. Eldridge and J.D. Edman, Medical Entomology. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers*, 461-514.
- Foil, L.D. & Hogsette, J.A. (1994) Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies. *Revue scientifique et technique de l'Office International des Épizooties*, **13** (4), 1125-1158.

- Foil, L.D., Meek, C.L., Adams, W.V. & Issel, C.J. (1983) Mechanical transmission of equine infectious anemia virus by deer flies (*Chrysops flavidus*) and stable flies (*Stomoxys calcitrans*). *American Journal of Veterinary Research*, **44** (1), 155-156
- Fu, Y.X. (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, **147**, 915–925.
- Freitas, T.R. & Romero, C.H. (1991) Experimental transmission of bovine leucosis virus by leucocytes recovered from the stable fly *Stomoxys calcitrans* (L.). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **24**, 101-23.
- Gilles, J., Litrico, I., Tillard, E. & Duvallet, G. (2007) Genetic structure and gene flow along an altitudinal gradient among two Stomoxyine species (Diptera: Muscidae) on La Réunion Island. *Journal of Medical Entomology*, **44** (3), 433-439.
- Guindon, S. & Gascuel, O. (2003) A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, **52**, 696 –704.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95-98.
- Hamblin, M.T. & Veuille, M. (1999) Population structure among African and derived populations of *Drosophila simulans*: evidence for ancient subdivision and recent admixture. *Genetics*, **153**, 305-317.
- Hewitt, G. M. (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405, 907-913.
- Hogsette, J.A., Ruff, J.P. & Jones, C.J. (1987) Stable fly biology and control in the northwest Florida. *Journal of Agricultural Entomology*, **4** (1), 1-11.
- Jones, C.J., Hogsette, J.A., Patterson, R.B., Milne, D.E., Propp, D.G., Milio, J.F., Rickard, L.R. & Ruff, J.P. (1991) Origin of the stable flies (Diptera: Muscidae) on west Florida beaches: Electrophoretic analysis of stable fly dispersal. *Journal of Medical Entomology*, **28**, 787-795.
- Krafsur, E.S. (1993) Allozyme variation in stable flies (Diptera: Muscidae). *Biochemical Genetics*, **31**, 231-239.
- Krafsur E.S., Cummings M.A., Endsley M.A., Marquez J.G. and Nason J.D. (2005) Geographic differentiation in the house fly estimated by microsatellite and mitochondrial variation. *Journal of Heredity*, **96** (5):502-512.

- Lysyk, T.J. (1998) Relationships between temperature and life-history parameters of *Stomoxys calcitrans* (Diptera : Muscidae). *Journal of Medical Entomology* **35** (2), 107-119.
- Marquez, J.G., Cummings, M.A. & Krafur, E.S. (2007) Phylogeography of stable fly (Diptera: Muscidae) estimated by diversity at ribosomal 16S and *Cytochrome Oxidase I* mitochondrial genes. *Journal of Medical Entomology*, **44** (6), 998-1008.
- Matthews, S., Meehan, D.L.J., Onyabe, D.Y., Vineis, J., Nock, I., Ndams, I. & Conn, J. E. (2007) Evidence for late Pleistocene population expansion of the malarial mosquitoes, *Anopheles arabiensis* and *Anopheles gambiae* in Nigeria. *Medical and Veterinary Entomology*, **21**, 358–369.
- Meier, R., Shiyang, K., Vaidya, G. & Ng, P.K.L. (2006) DNA Barcoding and Taxonomy in Diptera: a tale of high Intraspecific Variability and Low Identification Success. *Systematic Biology*, **55** (5), 715-728.
- Miller, R. W., Pickens, L. G., Morgan, N. O., Thimijan, R. W. & Wilson, R. L. (1973) Effect of stable flies on feed intake and milk production of dairy cows. *Journal of Economic Entomology*, **66**, 711 – 713.
- Posada, D. & Crandall, K.A. (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, **14**, 817–818.
- Pramual, P., Kuvangkadilok, C., Baimai, V. & Walton, C. (2005) Phylogeography of the Black fly *Simulium tani* (Diptera: Simuliidae) from Thailand as inferred from mtDNA sequences. *Molecular Ecology*, **14**, 3989-4001.
- Ramos-Onsins, S.E. & Rosas, J. (2002) Statistical properties of new neutrality test against population growth. *Molecular Biological Evolution*, **19**, 2092-2100.
- Rogers, A.R. & Harpending, H. (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biological Evolution*, **9**:552–569.
- Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X. et al (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, **19**:2496–2497.
- Savolainen, P., Zhang, Y., Luo, J., Lundeberg, J. & Leitner, T. (2002) Genetic Evidence for an East Asian Origin of Domestic Dogs. *Sciences*, **298** (5598), 1610-1613.

- Sharpe, R. G., Harbach, R.E. & Butlin, R.K. (2000) Molecular variation and phylogeny of members of the Minimus group of *Anopheles* subgenus *Cellia* (Diptera: Culicidae). *Systematic Entomology*, **25**, 263-272.
- Simon, C., Buckley, T.R., Frati, F., Stewart, J.B. & Beckenbach, A.T. (2006) Incorporating Molecular Evolution into Phylogenetic Analysis, and a New Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers for Animal Mitochondrial DNA. Supplemental Material. *Annals of Entomological Society of America*, **37**, 545-79.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Lui, H. & Flook, P. (1994) Evolution, weighting and phylogenetic unity of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of Entomological Society of America*, **87**, 651-701.
- Swezey, C. (2001) Eolian sediment responses to late Quaternary climate changes: temporal and spatial patterns in the Sahara. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **167**, 119-155.
- Swofford, D.L. (2002) PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). *Sinauer Associates, Sunderland MA*.
- Szalanski, A.L., Taylor, D.B. & Peterson, R.D. (1996) Population genetics and gene variation of stable fly populations (Diptera: Muscidae) in Nebraska. *Journal of Medical Entomology*, **33**, 413-420.
- Tamura, K., Nei, M. & Kumar, S. (2004) Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, **101**, 11030-11035.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007) *MEGA4*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 1596-1599.
- Tautz, D., Arctander, P., Minelli, A., Thomas, R. H. & Vogler A.P. (2002) DNA points the way ahead in taxonomy. *Nature*, **418**, 479.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (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.

Trauth, M. H., Larrasoana, J.C., & Mudelsee, M. (2009) Trends, rhythms and events in Plio-Pleistocene African climate. *Quaternary Science Reviews*, **28**, 399–411.

Wieman, G.A., Campbell, J.B., Deshazer, J.A. & Berry, I.L. (1992) Effects of stable flies (Diptera, Muscidae) and Heat-stress on Weight-Gain and Feed-Efficiency of Feeder Cattle. *Journal of Economic Entomology*, **85**, 1835-1842.

Zumpt, F. (1973) The Stomoxyinae biting flies of the world. Taxonomy, biology, economic importance and control measures. *Gustav Fischer Verlag, Stuttgart*, 175pp.

Résumé des principaux résultats

- Les résultats de la phylogénie, des réseaux haplotypiques, de la différenciation génétique estimée entre paires de populations (F_{st}) et de l'analyse AMOVA montrent une nette différenciation entre les populations orientales et les populations des autres zones géographiques de *Stomoxys calcitrans*. La comparaison des séquences de COI par la mesure de la distance génétique (kimura 2 parameter) montre une séparation autour de 2% entre la population orientale et les autres populations. Ces résultats ne permettent pas de trancher entre l'hypothèse d'une seule espèce ayant des populations fragmentées ou de deux espèces séparées par une barrière de reproduction. L'époque de séparation de la population orientale des autres populations est estimée à l'époque du Pléistocène inférieur.
- L'isolement de *S. calcitrans* en deux groupes suggère la présence de deux zones de refuges. L'Afrique pourrait être un refuge qui a permis la colonisation des autres régions, à l'exception de la région orientale. Un autre refuge semble avoir existé dans la région orientale, mais dont la recolonisation est vraisemblablement limitée.
- Les données mitochondriales et nucléaires prouvent que la colonisation du Paléarctique, à partir de la région afrotropicale, est probablement ancienne, depuis le début du Pléistocène où les conditions climatiques du Sahara étaient encore favorables.
- la colonisation du Nouveau Monde et de la Nouvelle- Calédonie est vraisemblablement plus récente. Il s'agirait d'une double inoculation, à partir de la région paléarctique et de la région afrotropicale, déclenchée par la découverte de l'Amérique par Christophe Colomb. Ensuite, les pérégrinations transatlantiques, ayant favorisé les échanges commerciaux, sont responsables de la dispersion successive et continue de *S. calcitrans* vers le Nouveau Monde.
- L'expansion de la population orientale, paléarctique et afrotropicale a probablement eu lieu il y environ 15 000, 11 000 et 6 000, respectivement. Cette expansion semble être liée à la dernière période de glaciation et à l'évolution de l'Homme et de son nouveau mode de vie (sédentarisation, domestication...).

Conclusion Générale et Perspectives

Durant ces dernières décennies, la Terre a subi des évolutions écologiques, climatiques et démographiques favorisant l'émergence ou la propagation des maladies à transmission vectorielle. Le contrôle des populations de vecteurs est primordial dans la lutte contre ces maladies. Cependant, le succès des opérations de lutte anti-vectorielle est lié à une bonne connaissance du vecteur et de son environnement.

C'est sur la base de ce constat que nous avons entamé une étude phylogénétique du genre *Stomoxys*. Nos investigations ont permis pour la première fois chez les stomoxes de faire la lumière sur les relations phylogénétiques entre les différentes espèces, redéfinir les limites interspécifiques et de proposer un scénario évolutif.

Premièrement, nos résultats montrent que la phylogénie morphologique est insuffisante pour délimiter les relations phylogénétiques entre espèces du genre *Stomoxys*. En effet, nous ne disposons pas d'un nombre suffisant de caractères informatifs, en raison du manque de caractères morphologiques chez les adultes et de l'absence de données biologiques et morphologiques des stades immatures.

Cependant, la phylogénie moléculaire s'avère être plus efficace. L'analyse combinée des marqueurs mitochondriaux (COI et Cyt-b) et nucléaires (ITS2) supporte la paraphylie de *Stomoxys* à cause de l'apparition de *Prostomoxys saegerae* à l'intérieur du genre *Stomoxys*.

Les constructions phylogénétiques ont révélé la présence de trois clades fortement soutenus qui correspondent à la biogéographie, avec la probable origine orientale du groupe due à l'émergence basale de *S. indicus*. Le calibrage des horloges moléculaires a permis d'estimer la période de divergence du genre *Stomoxys* qui correspond vraisemblablement à la fin de l'Oligocène (≈ 23 -34 millions d'années). Ensuite, il y aurait eu divergence des clades B et C, il y a environ 20,8 millions d'années. La radiation des espèces majeures en Afrique a probablement eu lieu au Miocène. Cette dispersion vers l'Afrique était possible grâce à une connexion forestière entre la plaque africaine et la plaque eurasiennne au début du Miocène.

Durant le Miocène, les forêts tropicales africaines ont commencé à régresser en laissant la place à des savanes, associées à des régimes saisonniers de précipitations (deMenocal, 1995). Ces changements auraient été à l'origine d'une fragmentation des milieux, ce qui aurait probablement conduit à un isolement des populations et à la création de nouvelles entités génétiques. Ceci pourrait expliquer le groupement phylogénétique des espèces de stomoxes. De la sorte, il y aurait eu apparition du clade rassemblant toute les espèces africaines inféodées à la forêt primaire (*S. transvittatus*, *S. inornatus*, *S. omega* et *S. pallidus*). Ensuite,

le troisième clade serait apparu vers 18 millions d'années et il rassemble en différents sous-clades des espèces de savanes et des espèces de milieu anthropisé. Le premier sous-clade regroupe *S. niger niger* et *S. niger bilineatus*, espèces africaines. Les données morphologiques, écologiques et moléculaires (basées sur l'estimation de temps de divergence, il y a environ 16.4 millions d'années) sont fortement en faveur de deux espèces distinctes. Ainsi, nous proposons une élévation de ces deux sous-espèces au rang d'espèces. D'autres approches telles que la cytogénétique et le croisement pourraient confirmer notre hypothèse. Au niveau du deuxième sous-clade on distingue deux espèces africaines : *S. varipes* et *Prostomoxys saegearae*, du genre monotypique *Prostomoxys*. En conséquence, nous proposons de renommer *Prostomoxys saegearae* par *Stomoxys saegearae*. La longueur des palpes maxillaires par rapport à la taille du proboscis (un caractère retenu par Zumpt (1973) pour classer les genres de la tribu des Stomoxyini) est vraisemblablement un caractère adaptatif et semble être peu efficace.

Enfin le dernier sous-clade est formé par *S. calcitrans*, *S. sitiens* et *S. bengalensis*, espèces morphologiquement très similaires et décrites de milieux anthropisés. Actuellement, *S. calcitrans* a une répartition mondiale, *S. sitiens* se trouve à la fois en Asie et en région afrotropicale et enfin *S. bengalensis* se trouve uniquement en Asie. Ce dernier cluster, à vaste répartition, montre le retour des stomoxes vers l'Asie et la colonisation de nouveaux espaces. Les évènements de migration entre l'Afrique et la région orientale étaient encore possible jusqu'à la fin du Miocène, grâce à la connexion forestière qui existait encore à cette époque (Moreau, 1952), ce qui aurait probablement permis l'apparition de *S. bengalensis* en Asie. Pour *S. calcitrans*, on pourrait émettre l'hypothèse d'une spéciation en Afrique et ensuite une colonisation de la région orientale. En ce qui concerne *S. sitiens*, la dispersion se serait probablement déroulée soit à la même époque de colonisation que *S. bengalensis*, soit par le même processus de colonisation que *S. calcitrans*. Un échantillonnage plus approprié de *S. sitiens*, au niveau des deux continents, et éventuellement une étude phylogéographique de cette espèce, pourraient nous apporter des réponses complémentaires.

Quant à *S. calcitrans*, une analyse phylogéographique a été entamée pour mieux comprendre sa distribution. Les résultats de cette analyse montrent une différenciation entre les populations orientales et les autres populations. Cette séparation (K2P \approx 2%) a été datée aux alentours du Pléistocène inférieur.

La séparation de *S. calcitrans* en deux groupes laisse supposer la présence de deux zones de refuge. Le premier point de refuge est probablement situé en Afrique tandis que le deuxième, moins précis, serait situé en région orientale. Les populations afrotropicales ont clairement pu envahir le reste du monde, à l'exception de la région orientale, par diverses voies et à différentes périodes. La population orientale est isolée, il n'y a pas eu de ce fait une dispersion de *S. calcitrans* vers les autres régions.

La colonisation du Paléarctique, à partir de la région afrotropicale, est probablement ancienne. Au début du Pléistocène, les conditions climatiques du Sahara étaient encore humides, à la fin du Pléistocène/début Holocène, le Sahara acquiert son climat aride actuel. Le Sahara a probablement limité la migration de *S. calcitrans* vers le Paléarctique. Cependant, la colonisation du Nouveau Monde et de la Nouvelle-Calédonie est vraisemblablement plus récente, suite à l'exploration de l'Amérique par Christophe Colomb. Après cette découverte, les voyages transatlantiques ont augmenté permettant une double inoculation de *S. calcitrans* à partir de la région Paléarctique et de la région afrotropicale.

Les conditions climatiques en même temps que l'évolution de l'Homme et de son mode de vie auraient certainement permis l'expansion de *S. calcitrans*. Il est possible que la domestication du chien soit l'élément clé de cette expansion.

La liaison étroite de *S. calcitrans* avec la présence humaine, fait que des mesures prophylactiques de base doivent être prises en compte pour limiter l'expansion de cette espèce. Rappelons qu'en 1993, aux Etats-Unis, les pertes économiques infligées par les stomoxes au niveau des élevages ont été estimées à 100 millions de dollars (Foil & Hogsette, 1994). Il est évident que la propreté des bâtiments d'élevages et des abords, ainsi qu'une bonne ventilation et aération des bâtiments contribueront à diminuer les lieux de vie et les cycles de reproduction des stomoxes et à une meilleure efficacité des insecticides. Faute de connaissances suffisantes sur les stades larvaires et leurs lieux de vie, les moyens de lutte sont focalisés uniquement sur les adultes. Pourtant, une lutte contre les stades larvaires permettrait de limiter les mouches avant leur prolifération.

S. calcitrans est très étroitement inféodé à l'Homme, sa propagation dans le monde est vraisemblablement liée à l'expansion et aux activités humaines. Chez certaines espèces on reconnaît déjà le phénomène de domestication qui aurait permis l'invasion de ces espèces, telles

que *Drosophila melanogaster* et *Musca domestica*. Lachaise & Silvain (2004) ont avancé que la domestication de *D. melanogaster* serait un processus d'évolution. Ils émettent leur hypothèse de la manière suivante: « It could be argued that evolution in this lineage simply led to the loss of the 'wild' strategy, probably because the 'domestic' strategy was favored by selection »...« As a result, we assume that the shift to domestic habit is an evolutionary response for species that are unable to adapt readily to changing natural environments and hence suffer severe population bottlenecks. We suggest that the reasons why *D. melanogaster* became strictly domestic may be its poor and constrained demographic capabilities ». Il est possible que *S. calcitrans* ait aussi développé une stratégie de domestication pour faire face aux contraintes démographiques.

S. calcitrans est la seule espèce qui a pu envahir le monde et élargir son aire de répartition, pourtant d'autres espèces de *Stomoxys* sont aussi anthropophiles, ou du moins on les trouve à la fois en savane et en milieu anthropisé, telles que *S. sitiens* et *S. niger*. Les résultats d'écophysiologie de Gilles *et al.* (2005), à l'île de la Réunion, montrent qu'à 15°C *S. calcitrans* est capable d'achever son cycle de développement, tandis que *S. niger* est incapable de se reproduire (le taux intrinsèque d'accroissement $r < 0$). *S. calcitrans* a ainsi développé une stratégie d'hivernation, dans les régions tempérées, lui permettant de s'accroître et maintenir sa taille effective. Au contraire, *S. niger*, espèce tropicale, semble développer une stratégie de survie sans reproduction pendant la saison de l'hiver. Ceci pourrait être une partie de l'explication pourquoi seule *S. calcitrans* est devenue cosmopolite. En effet, les conditions climatiques qu'on trouve en région néotropicale sont semblables à celles de la région afrotropicale, et pourtant on ne trouve pas *S. niger*. D'après Zumpt (1973), Fiasson (1943) aurait trouvé *S. niger* en Venezuela, cependant cette information n'a pas été confirmée. Vraisemblablement, *S. niger niger* est présente dans les îles du Cap-Vert et les îles Canaries. Il est donc judicieux d'examiner en premier la présence ou l'absence de *S. niger* en région néotropicale et d'entreprendre par la suite une analyse phylogéographique de cette espèce. Une autre espèce a été décrite en milieu anthropisé, il s'agit de *S. sitiens*, se trouvant à la fois sur le continent asiatique et le continent africain. Peu d'informations concernant la biologie de cette espèce sont disponibles. Néanmoins, on pourrait se poser la question pourquoi *S. sitiens* n'a pas pu élargir son aire de répartition ? Puisqu'elle semble être liée à la présence humaine comme *S. calcitrans*. Une étude d'écophysiologie et de phylogéographie de *S. sitiens* pourrait nous apporter des éléments de réponse.

Glossaire

AIC (Akaike Informative Criterion): Critère Informatif d'Akaike est utilisé pour comparer les modèles d'évolution des séquences et est défini par la formule suivante : $AIC = 2k - 2\ln L$ où L est la vraisemblance maximisée et k le nombre de paramètres dans les modèles

Analogie: des caractères qui se ressemblent (ou similaires), mais non homologues, remplissant les même fonctions biologiques. L'analogie est un cas particulier de l'homoplasie.

Apomorphe: " apo = séparation, morphe = forme ". Qualifie en phylogénie un état dérivé d'un état ancestral.

Arbre consensus : comme la méthode du maximum de parcimonie peut conduire à trouver plusieurs arbres équivalents, on peut créer un arbre consensus (avec utilisation du bootstrapping). Cet arbre consensus est construit à partir des nœuds les plus fréquemment rencontrés sur l'ensemble des arbres possibles.

Autapomorphie: adj. Lors d'une comparaison entre groupes-frères, se dit de l'état dérivé d'un caractère propre à l'un des deux taxons.

Bootstrap: utilisée pour tester la fiabilité des branches internes. Le bootstrap consiste à effectuer un tirage des sites au hasard avec remise, donc dans chaque réplication de bootstrap certains sites peuvent être présents plusieurs fois, tandis que les autres peuvent être absents. Chaque réplication produit un nouvel alignement "artificiel" qui est utilisé pour construire un arbre "artificiel". Pour chaque branche interne, on calcule le pourcentage des arbres "artificiels" contenant cette branche. On considère généralement que les branches définies par une valeur de bootstrap de $> 95\%$ sont fiables.

Bottleneck (population): le goulot d'étranglement se produit lorsqu'une population subit une sévère réduction de sa taille. Dans une population, le goulot d'étranglement est un facteur diminuant de la diversité génétique.

Caractère : un caractère est une particularité anatomique ou moléculaire définie par un chercheur. Un caractère se divise en au moins deux états : primitif plésiomorphe ou dérivé apomorphe

Clade: " clados = branche ". En phylogénie, branche ou taxon qui contient un ancêtre et tous ses descendants.

Cladistique: méthode de comparaison des taxons entre eux. Un taxon est défini comme un ensemble de caractères, chacun dans un certain état de caractères. Les taxons sont rassemblés deux par deux (on parle de groupes frères) en fonction des caractères qu'ils présentent dans leurs états dérivés uniquement.

Cladogramme: diagramme montrant des relations de parenté entre différents taxons. Un cladogramme n'est pas un arbre évolutif et ne peut permettre d'établir un scénario évolutif.

Convergence: ressemblance apparue indépendamment dans différents taxons, par conséquent non héritée de l'espèce ancestrale à ces taxons.

Distances (méthode de): La première étape consiste à calculer la distance évolutive (c'est-à-dire le nombre de substitutions) entre deux séquences, en général à l'aide de méthodes statistiques utilisant un modèle d'évolution des séquences. Cela aboutit à l'édification d'une matrice de distances entre toutes les paires de séquences. Différents algorithmes, comme le célèbre *neighbor joining*, permettent de construire rapidement un arbre à partir de cette matrice.

Distance évolutive

Distance évolutive entre 2 séquences est égal au nombre de substitutions qui se sont produites sur les 2 lignées évolutives depuis l'ancêtre commun / nombre de sites. La distance évolutive est égale à la distance observée uniquement si les séquences sont très proches et le nombre de substitutions observées correspond au nombre de substitutions qui se sont réellement produites. En effet, la distance observée est presque toujours une sous-estimation de la distance évolutive. Plusieurs événements, qui ont pu éventuellement se produire, ne sont pas pris en considération dans son calcul. Pour en tenir compte, plusieurs modèles ont été développés afin de corriger les distances observées.

Évolution des séquences (modèles):

Modèle de Jukes-Cantor (JC) : 1 paramètre

- les 4 bases ont les mêmes fréquences ($\pi_A = \pi_T = \pi_G = \pi_C$)
- les transitions (α) et les transversions sont équiprobables ($\alpha = \beta$)

Formule: $d_{xy} = -\frac{3}{4} \ln(1 - \frac{4}{3} D)$, où D est la distance observée, les termes 3/4 et 4/3 correspondent aux quatre types de nucléotides et aux trois possibilités que le deuxième nucléotide peut être différent du premier.

- Modèle de Kimura (K2P) : 2 paramètres

- les 4 bases ont les mêmes fréquences ($\pi_A = \pi_T = \pi_G = \pi_C$)

- les transitions (α) et les transversions (β) ne sont pas équiprobables ($\alpha \neq \beta$)

- Modèle de Tajima-Nei (TN) = Felsenstein (F81) : 6 paramètres

- les 4 bases ont les fréquences différentes ($\pi_A \neq \pi_T \neq \pi_G \neq \pi_C$)

- les transitions et les transversions sont équiprobables ($\alpha = \beta$)

- Modèle de Hasegawa, Kishino et Yano (HKY 85) : 6 paramètres

- les 4 bases n'ont pas les mêmes fréquences ($\pi_A \neq \pi_T \neq \pi_G \neq \pi_C$)

- les transitions (α) et les transversions (β) ne sont pas équiprobables ($\alpha \neq \beta$)

- Modèle GTR (General Time Reversible) : 10 paramètres

- les 4 bases ont des fréquences différentes ($\pi_A \neq \pi_T \neq \pi_G \neq \pi_C$)

- il existe 6 types de substitutions (AC, AT, AG, CT, CG, TG)

Paramètres additionnels : distribution gamma (G) et proportion de sites invariables (I). La distribution gamma est utilisée pour corriger les variations de substitutions entre les différents sites. Le paramètre G est évalué à partir des données et correspond à l'intervalle de variations. Plus G est petite, plus l'intervalle des variations est grand. On peut décider qu'une certaine fraction de sites est invariable (ce qui correspond à un paramètre supplémentaire I), auquel cas la distribution gamma ne s'appliquera qu'aux sites libres de varier. On peut inclure les paramètres α et I dans différents modèles de changements évolutifs, par exemple : GTR + G + I (12 paramètres)

Fu's Fs: test statistique basé sur la distribution des haplotypes pour détecter une éventuelle expansion démographique de populations. Ce test est préconisé quand l'échantillonnage est important. Si Fu's Fs est fortement négatif significativement, suggère une population en expansion.

Homologie: " omo = semblable, logos = étude ". Deux états de caractères sont dits homologues s'ils sont hérités d'une même structure commune.

Homoplasie: En phylogénie, similarité chez différentes espèces d'un organe ou partie d'organe qui ne provient pas de l'hérédité d'un ancêtre commun. On distingue plusieurs cas d'homoplasie : l'analogie, la convergence, le parallélisme, la réversion.

Plusieurs indices ont été développés afin de mesurer le taux d'homoplasie et ainsi d'évaluer la confiance que l'on peut avoir dans un arbre.

- consistency index (CI) - indice de cohérence

Pour un caractère donné, l'indice de cohérence est égal au nombre minimum **m** de changements possibles du caractère (c'est-à-dire le nombre total des états du caractère moins un) divisé par le nombre de changements observés **s**.

Pour un arbre donné, l'indice de cohérence $CI = M / S$, où **M** et **S** sont égal respectivement à la somme de **m** et de **s** de tous les caractères.

- homoplasy index (HI) - indice des homoplasies $HI = 1 - CI$

- retention index (RI) - indice de rétention $RI = (G - S) / (G - M)$ où **G** est égal à la somme de changements pour tous les caractères dans un arbre complètement polytomique.

- rescaled consistency index (RC) $RC = CI \times RI$, RC est défini comme le produit de l'indice de cohérence **C** et de l'indice de rétention **R**.

Horloge moléculaire (hypothèse de l'): hypothèse selon laquelle les molécules d'une même classe fonctionnelle évoluent régulièrement dans le temps et à rythme égal dans différentes lignées. Ainsi la quantité des différences moléculaires constatées de nos jours dans des séquences homologues d'espèces distinctes peut être utilisée pour estimer le temps écoulé depuis le dernier ancêtre commun à ces deux espèces (ou temps de divergence).

Inférence bayésienne (méthode): C'est une méthode qui fait appel au concept des probabilités postérieures (le théorème de Bayes), où la probabilité est estimée sur la base d'un modèle et d'une certaine connaissance des données. $Pr(H/D) = (Pr(H/D) \times Pr(H)) / Pr(D)$, où H est un hypothétique arbre phylogénétique et les données D sont les séquences comparées.

En pratique, la probabilité postérieure d'une topologie est impossible à calculer, mais elle peut être approximée en utilisant la méthode de Monte Carlo par chaînes de Markov (MCMC), qui échantillonne des arbres en proportion de leur PP.

Matrice (de caractère): tableau à double entrée comportant, en général, verticalement une série d'espèces (ou de taxons) et horizontalement une série de caractères. Dans les cases du tableau, figurent sous forme codée les états des caractères pour chacun des taxons. L'analyse cladistique des caractères donne lieu à une telle matrice, les états sont généralement codés 0, 1, 2, ect.

Maximum de vraisemblance (méthode): La vraisemblance est la probabilité d'observer les données D sachant l'hypothèse H $\Rightarrow L = Pr(D/H)$

La démarche consiste donc à rechercher la vraisemblance des données D sous différentes hypothèses évolutives H d'un modèle M et à retenir les hypothèses qui rendent cette

vraisemblance maximale. Comme le nombre L est souvent très petit, il est exprimé en forme d'un logarithme naturel $\ln L$.

Dans le cas d'analyse des séquences, les données D sont des séquences comparées et l'hypothèse H est l'arbre phylogénétique. Nous cherchons à trouver l'arbre dont la vraisemblance, étant donné les séquences observées et le modèle d'évolution choisi, est maximale. La vraisemblance de l'arbre n'est pas la probabilité que l'arbre est "vrai"

Mismatch distribution: Représentation graphique de la distribution du nombre des différences génétiques existant entre les individus d'une population pris deux à deux.

Monophylétique (groupe): " monos = seul, unique, phylon = tribu, peuple, race ". En phylogénie, se dit d'un groupe qui contient un ancêtre et tous ses descendants. On nomme également d'un groupe monophylétique qu'il est un clade.

Monotypique: adj. - Un genre (taxon) est dit monotypique lorsqu' 'il a été établi qu'à partir de l'existence attestée d'une seule espèce (taxon). Une espèce est dite monotypique si elle ne comprend pas de sous-espèces.

Multifurcation: c'est un nœud à plus de trois branches ou segments de branches. La multifurcation signifie que les relations phylogénétiques des groupes (branches) concernés ne sont pas résolues.

Parallélisme: ressemblance apparues indépendamment dans différents taxons proches parents : un même état apomorphe est atteint à plusieurs reprises, et par différents taxons, à partir d'un même caractère ancestral. Le parallélisme est un cas particulier de la convergence.

Paraphylétique (groupe): " para = à côté de, proche de; phylon = tribu, race ". En phylogénie, se dit d'un groupe qui comprend une espèce ancestrale et seulement une partie de ses descendants. Un groupe paraphylétique est défini par au moins une synplésiomorphie ou une absence de caractère.

Parcimonie (méthode): Méthode de construction de phylogénies qui, parmi tous les dendrogrammes (arbres) possibles, retient celui qui présente le plus petit nombre d'événements évolutifs (changements d'état de caractères). Le but est de produire, par l'étude des caractères, l'arbre phylogénique le plus proche de la réalité (le plus probable).

Phénétique : se dit d'une classification établie d'après la similitude des taxons entre eux. Dans ce cas, elle n'est pas construite en fonction des états de caractères, apomorphes ou plésiomorphes.

Phylogénie: " phylon = tribu, race, peuple; genos ou generis = origine, naissance ". Cours historique de la descendance des êtres organisés.

Phylogramme: en cladistique, c'est un dendrogramme montrant les relations phylogénétiques en termes d'histoire généalogique inférée; l'identité des nœuds (ancêtres) est spécifiée, la connexion des lignes représente le taxon ancestral, et les taxons inclus ne sont pas tous en position terminale.

Plésiomorphe: adj, opposé à apomorphe. Un état de caractère est dit plésiomorphe (ancien) par rapport à un état plus dérivé. C'est une notion relative, pas absolue.

Polarisation: opération qui consiste à déterminer la séquence évolutive de la transformation d'un caractère, de son état plésiomorphe à son état apomorphe.

Polyphylétique (groupe): " polys = nombreux, phylon = tribu, race, peuple ". En phylogénie, se dit d'un groupe qui contient un certain nombre d'espèces ou de taxons, sans contenir l'ancêtre commun à tous.

Pondération (des caractères): La pondération des caractères vise à donner un poids plus important aux caractères que l'on juge porteurs d'une information phylogénétique plus significative.

Réversion: un état dérivé d'un caractère revient à un état semblable à l'état primitif (plésiomorphe). Plus généralement, dans une série de transformations d'un caractère (d'un état primitif à ses états dérivés), la réversion est retour à un état morphologique ou moléculaire semblable à celui d'un stade précédent. La réversion est un cas particulier de l'homoplasie.

Scénario: hypothèse historique servant à expliquer certains patterns : présence de tels taxons à tels endroits...

Substitution: type de mutation dans une séquence qui consiste en un remplacement d'un ou de plusieurs acide (s) aminé (s) par un ou plusieurs autres, d'un ou de plusieurs nucléotide (s) par un ou plusieurs autres.

Simplésiomorphie (caractère): adj, caractère plésiomorphe présent chez deux ou plusieurs taxons.

Synapomorphie (caractère): adj, caractère apomorphe partagé par deux ou plusieurs taxons.

Systematique: " systematicos = qui forme un tout et répond à un ensemble de principes ".
Science des classifications biologiques et des relations évolutives entre organismes.

Systematique : science qui hiérarchise les organismes vivants, et essaie de retrouver les relations de parentés entre eux.

Taxinomie ou Taxonomie: " taxis ou taxeôs = ordre, arrangement ; nomos = loi, règle ".
Science de la classification des êtres vivants. Elle inclut la reconnaissance, l'identification des formes vivantes et leur rangement avec une classification.

Temps de divergence (ou temps de séparation, entre deux taxons) : date du dernier ancêtre commun à deux taxons. Plus précisément et en d'autres termes, date à laquelle l'espèce-ancêtre commune à deux taxons a perdu son intégrité génétique, c'est à dire a subi une spéciation.

Test R2 (Ramos-Onsins et Rozas, 2002): calcule la différence entre le nombre de mutations uniques par rapport à la moyenne du nombre de différences partagées par deux individus : une population récente en expansion conduira à une faible valeur de cet indice. Test mieux adapté pour faible échantillonnage

Systematique évolutionniste: courant de systematique qui tente à la fois de présenter les relations phylogénétiques et les divergences des êtres vivants entre eux.

Systematique phylogénétique : cette systematique se base sur le principe du cladisme. Elle rejette les groupes non monophylétiques (ou non clades). Seuls les clades peuvent avoir un nom.

Taxon: unité de classement utilisée en systematique. Les taxons sont une espèce, un genre, une famille, un ordre, une classe, etc.

Références bibliographiques

(Hors articles)

- Avise, J.C. (2000) Phylogeography. The history and Formation of Species. *Havard University Press, Cambridge, MA*, 464 pp.
- Bailey, D.L., Whitfield, T.L. & Smittle, B.J. (1979) Flight and dispersal of the stable fly. *Journal of Economic Entomology*, **66**, 410-411.
- Barré, N. (1981) Les stomoxes ou mouches boeuf à La Réunion. Pouvoir pathogène, écologie, moyen de lutte. Maison Alfort (FRA) - GERDAT-IEMVT, 90 pp.
- Berkebile, D.R., Thomas, G.D. & Campbell, J.B. (1994) Overwintering of the stable fly (Diptera: Muscidae) in southeastern Nebraska. *Journal of Economical Entomology*, **87**(6):1555-1563.
- Berry, I.L. & Campbell, J. B. (1985) Time and weather effects on daily feeding patterns of stable flies (Diptera : Muscidae). *Environmental Entomology*, **14**, 336-342.
- Berry, I.L., Forester, K. W. & Ilcken, E.H. (1976) Prediction model for development time of stable flies. *Transactions of the Asae*. **19**(1), 123-127.
- Berry, I.L., Forester, K. W. & Campbell, J. B. (1978) Overwintering behaviour of stable flies in manure mounds. *Environmental Entomology*, **7**, 67-72.
- Berry, I.L., Kunz, S.E. & Forester, K. W. (1977) Dynamic model of physiological development of immature Stables Flies Diptera-Muscidae. *Annals of the Entomological Society of America*, **70** (2), 173-176.
- Berry, I.L., Nelson, A.K. & Broce, A.B. (1986) Effects of weather on capture of stable flies (Diptera: Muscidae) by alsynite fiber glass traps. *Environmental Entomology*, **15**, 706-709.
- Bishopp F.C. (1913). The stable fly (*Stomoxys calcitrans* L.), an important live-stock pest. *Journal of Economic Entomology*, **6** , 112-126.
- Broce, A.B. (1988) An improved alsynite trap for stable flies, *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology*, **25**: 406-409.
- Bruce, W.N. & Decker, G.C. (1958) The relationship of stable fly to milk production in dairy cattle. *Journal of Economic Entomology*, **51** (3), 269-275.
- Campbell, J.B., Berry, I.L., Boxler, D.J., Clanton, D.C & Deutscher, G.H. (1987) Effects of stable fly (Diptera: Muscidae) on weight gain and feed efficiency of feedlot cattle. *Journal of Economic Entomology*, **80**, 117-119.

- Campbell, J.B., White, R.G., Wright, J.E., Crookshank, R. & Clanton, D.C. (1977) Effects of stable flies (Diptera-Muscidae) on weight gains and feed-efficiency of calves on growing and finishing rations. *Journal of Economic Entomology*, **70** (5), 592-594.
- Castro, J.D. (1967) Chemical Sterilization of the Stable Fly, *Stomoxys calcitrans*(Linnaeus), with Metepa and Hempa. Ph.D. dissertation, University of Florida, Gainesville, FL.
- Chantal, J. (1997) Actualités de l'Anthrax ou fièvre charbonneuse. *Médecine Tropicale*, **57**, 52-60.
- Charlwood, J.D. & Lopes, J. (1980) Age structure and biting behaviour of *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae) from Manaus, Brazil. *Bulletin of Entomological research*, **70**, 549-555.
- Charlwood, J.D. & Sama, S. (1996) The age structure, biting cycle and dispersal of *Stomoxys niger* Macquart (Diptera: Muscidae) from Ifakara, Tanzania. *African Entomology*, **4** (2), 274-277.
- D'Amico, F., Gouteux, J.P., Le Gall, F. & Cuisance, D. (1996) Are stable fly (Diptera: Stomoxyinae) vectors of *Trypanosoma vivax* in the central Africa Republic. *Veterinary Research*, **27**: 161-170.
- Darlu, P. & Tassy, P. (1993) Reconstruction Phylogénétique, concepts et méthodes. *Editions Masson*, 244 pp.
- Darwin, C. (1868) De la variation des animaux et des plantes à l'état domestique. *Editions Reinwald*, t. **1**, p. 10.
- Darwin, C. (1876) L'origine des espèces au moyen de la sélection naturelle ou la lutte pour l'existence dans la nature. *Editions Reinwald, Paris*.
- David, P. & Samadi, S. (2000) La théorie de l'évolution. Une logique pour la biologie. *ChampsUniversité, Flammarion*, 312 pp.
- Dawkins, R. (1978) Le gène égoïste. *Editions Menges, Paris*.
- deMenocal, P. B. (1995) Plio-Pleistocene African climate. *Science*, **270**, 53-59.
- Dobzhansky, T. (1937) Genetics and the Origin of Species. *The Columbia Classics in Evolutionary Series. Columbia Univ. Press, New York*, 364 pp.

- Dougherty, C.T., Knapp, F.W., Burrus, P.B., Willis, D.C. & Cornelius, P.L. (1995) Behaviour of grazing cattle exposed to small populations of stable flies (*Stomoxys calcitrans* L.). *Applied Animal Behaviour Sciences*, **42**, 231-248.
- Dsouli-Aymes, N., Mavoungou, J.F., De Stordeur, E. & Duvallet, G. (2009) Landscape, population structure and genetic diversity of *Stomoxys calcitrans*. *Parasite*, **16**, 37-41.
- Eigen, M., Kloft, W.J. & Brandner, G. (2002) Transferability of HIV by arthropods supports the hypothesis about transmission of the virus from apes to man. *Naturwissenschaften*, **89** (4), 185-186.
- Eldredge, N. & Gould, S.J. (1972) "Punctuated Equilibrium: An Alternative to Phyletic Gradualism", *Models in Paleobiology*. Edited by Schopf T.J.M., Freeman Cooper & Co., San Francisco.
- Epstein, P. (2001) Climate change and emerging infectious diseases. *Microbes and Infection*, **3**, 747-754.
- Foil, L.D. & Gorham, J.R. (2000) Mechanical transmission of disease agents by arthropods. In: B.F. Eldridge and J.D. Edman, *Medical Entomology*. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers: pp 461-514.
- Foil, L.D. & Hogsette, J.A. (1994) Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies. *Revue scientifique et technique de l'Office International des Épizooties*, **13** (4), 1125-1158.
- Foil, L.D. & Issel, C.J. (1991) Transmission of retroviruses by arthropods. *Annual Review of Entomology*, **36**, 355-381.
- Garros, C., Gilles, J. & Duvallet, G. (2004) Un nouveau caractère morphologique pour distinguer *Stomoxys calcitrans* et *S. niger* (Diptera : Muscidae). Comparaison de populations de l'île de La Réunion. *Parasite*, **11**, 329-332.
- Gatehouse, A.G. & Lewis, C.T. (1973) Host location behaviour of *Stomoxys calcitrans*. *Entomologica Experimentalis et Applicata*, **16**, 275-290.
- Gilles, J., David, J.F. & Duvallet, G. (2005 b) Temperature effects on development and survival of two stable flies, *Stomoxys calcitrans* and *Stomoxys niger* (Diptera : Muscidae), in La Réunion Island. *Journal of Medical Entomology*, **42** (3), 260-265.

- Gilles, J., David, J.F. & Duvallet, G. (2005 c) Effects of temperature on the rate of increase of two stable flies from La Réunion island, *Stomoxys calcitrans* and *Stomoxys niger niger* (Diptera : Muscidae). *Journal of Medical Entomology*, **42** (6), 959-965.
- Gilles, J., David, J.F., Duvallet, G. & De La Rocque, S. (2007a) Efficiency of traps for *Stomoxys calcitrans* and *Stomoxys niger niger* on Reunion Island. *Medical and Veterinary Entomology*, **21**, 65-69.
- Gilles, J., Litrico, I. & Duvallet, G. (2005 a) Microsatellite loci in the stable fly, *Stomoxys niger niger* (Diptera : Muscidae) on La Réunion Island. *Molecular Ecology Notes*, **5**, 93-95.
- Gilles, J., Litrico, I., Tillard, E. & Duvallet, G. (2007b) Genetic structure and gene flow along an altitudinal gradient among two Stomoxyine species (Diptera: Muscidae) on La Réunion Island. *Journal of medical Entomology*, **44** (3), 433-439.
- Gould, S.J. (1988) Le sourire du flamant rose - Réflexions sur l'histoire naturelle. *Editions du Seuil*, 465-477.
- Hafez, M. & Gamal-Eddin, F.M. (1959 a) Ecological studies on *Stomoxys calcitrans* L. and *sitiens* Rond in Egypt, with suggestions on their control. *Bulletin de la Société d'Entomologie d'Egypte*, **43**, 245-254.
- Hafez, M. & Gamal-Eddin, F.M. (1959 b) On the feeding habits of *Stomoxys calcitrans* L. and *sitiens* Rond., with special reference to their biting cycle in nature. *Bulletin de la Société d'Entomologie d'Egypte*, **43**, 291-301.
- Hafez, M. & Gamal-Eddin, F.M. (1961) The behaviour of the stable fly larva, *Stomoxys calcitrans* L., towards some environmental factors. *Bulletin de la Société d'Entomologie d'Egypte*, **45**, 341-367.
- Harry, M. (2001) Génétique moléculaire et évolutive. *Edition Maloine, Paris*, 326pp.
- Harry, M. Solignac, M & Lachaise, D. (1998) Molecular evidence for parallel evolution of Adaptive syndromes in Fig-Breeding *Lissocephala* (Drosophilidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **9** (3) ,542-551.
- Hennig, W. (1965) Phylogenetic Systematics. *Annual Review of Entomology*, **10**: 97-116.
- Hewitt, C.G. (1910), The housefly, *Musca domestica* Linnaeus. A study of its structure, development, bionomics and economy. *Publications of the University of Manchester, Biological series*, **1**. 195p.

- Hoch, A.L., Gargan, T.P. & Bailay, C.L. (1985) Mechanical transmission of Rift Valley fever virus by hematophagous Diptera. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **34** (1), 188-193.
- Hogsette, J.A., Nalli, A & Foil, L.D. (2008) Evaluation of different insecticides and fabric types for development of treated targets for stable fly (Diptera: Muscidae) control. *Journal of Economical Entomology*, **101**(3), 1034-1038.
- Hogsette J. & Ruff, J.P. (1990) Comparative attraction of four different fibreglass traps to various age and sex classes of stable fly (Diptera: Muscidae) adults. *Journal of Economical Entomology*, **83**(3), 883-886.
- Hogsette, J.A., Ruff, J.P. & McGowan, M.J. (1981) Stable fly integrated pest management (IPM) in Northwest Florida. *Journal of the Florida Anti-Mosquito Association*, **52**, 48-52.
- Hogsette, J.A., Ruff, J.P. & Jones, C.J. (1987) Stable fly biology and control in the northwest Florida. *Journal of Agricultural Entomology*, **4** (1), 1-11.
- Itard, J., Chartier, P.C., Morel, P.C. & Troncy P.M. (2000) Précis de parasitologie vétérinaire tropicale. Paris, Cachan, technique et documentation, édition médicale internationale, 774 pp.
- Jones, C.J., Hogsette, J.A, Patterson, R.S. & Milne, D. E. (1985) Effects of natural scharide and pollen extract feeding on stable fly (Diptera: Muscidae) longevity. *Environmental Entomology*, **14** (1), 223-227.
- Jones, C.J., Hogsette, J.A, Patterson, R.S., Milne, D. E., Propp G.D., Milio J.A., Rickard L.G. & Fuff J.P. (1991) Origin of stable fly (Diptera: Muscidae) on west Florida beaches: electrophoretic analysis of dispersal. *Journal of Medical Entomology*, **28**, 787-795.
- Jones, C.J., Milne, D. E. Patterson R.S., Schreiber E.T. & Milio J.A. (1992). Nectar Feeding by *Stomoxys calcitrans* (Diptera, Muscidae), Effects on Reproduction and Survival. *Environmental Entomology*, **21** (1), 141-147.
- Kangwagye, T.N. (1973) Diurnal and nocturnal biting activity of flies (Diptera) in western Uganda. *Bulletin of entomological Research*, **63**, 17-29.
- Kimura, M. (1983) The Neutral Theory of Molecular Evolution. *Cambridge University Press, Cambridge*. (Traduit de l'anglais par Claudine Montgelard, *Théorie neutraliste de l'évolution*, Flammarion, 1990).

- Krafsur, E.S. (1993) Allozyme variation in stable flies (Diptera: Muscidae). *Biochemical Genetics*, **31**, 231-239.
- Kunz, S.E., Berry, I.L. & Forester, K.W. (1977) Development of immature forms of *Stomoxys calcitrans* Diptera-Muscidae. *Annals of the Entomological Society of America*, **70** (2), 169-172.
- Kunz, S.E. & Monty, J. (1976) Biology and ecology of *Stomoxys nigra* Macquart and *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera, Muscidae) in Mauritius. *Bulletin of Entomological Research*, **66**, 745-755.
- La Breque, G.C., Weidhaas, D.E. & Whitfield, T.L. (1975) Graphic models as intermediate steps to computerized simulations of stable fly populations. *Mosquito News*, **35**, 316-321.
- Lamarck, J.B. (1809) Philosophie zoologique. *Dentu, Paris*.
- Laveissière, C. & Grébaut, P. (1990) The trapping tsetse flies (Diptera : Glossinidae). Improvement of a model: the Vavoua trap. *Tropical Medicine and Parasitology*, **41**, 185-192.
- Leclercq, M. (1971) Les mouches nuisibles aux animaux domestiques. *Presses Agronomiques de Gembloux*, 199 pp.
- Lysyk, T.J. (1993) Adult resting and larval development sites of stable flies and house flies (Diptera : Muscidae) on dairies in Alberta. *Journal of Economic Entomology*, **86** (6), 1746-1753.
- Lysyk, T.J. (1995), Temperature and population density effects on feeding activity of *Stomoxys calcitrans* (Diptera : Muscidae). *Journal of Medical Entomology* **32** (4), 508-514.
- Lysyk, T.J. (1998) Relationships between temperature and life-history parameters of *Stomoxys calcitrans* (Diptera : Muscidae). *Journal of Medical Entomology* **35** (2), 107-119.
- Lysyk, T.J. & Krafsur, E.S. (1993) Relationship between pterin accumulation and ovarian development in the Stable fly *Stomoxys calcitrans* (L) (Diptera, Muscidae). *Canadian Entomologist*, **125** (5), 869-879.
- Marquez, J.G., Cummings, M.A. & Krafsur E.S. (2007) Phylogeography of stable fly (Diptera: Muscidae) estimated by diversity at ribosomal 16S and *Cytochrome Oxidase I* mitochondrial genes. *Journal of Medical Entomology*, **44** (6), 998-1008.

- Masmeatathip, R., Gilles, J., Ketavan, C. & Duvallet, G. (2006 a) First survey of seasonal abundance and daily activity of *Stomoxys* spp. (Diptera : Muscidae) in Kamphaengsaen campus, Nakornpathom Province Thailand. *Parasite*, **13**, 245-250.
- Masmeatathip, R., Ketavan, C. & Duvallet, G. (2006 b) Morphological Studies of *Stomoxys* spp. (Diptera: Muscidae) in central Thailand. *Kasetsart Journal*, **40**, 872-881.
- Mavoungou, J.F., Jay-Robert, P., Gilles, J., Atsame, E.A. & Duvallet, G. (2008) Ecology of *Stomoxys* flies (Diptera:Muscidae) in Gabon. First survey in different ecological areas. *Parasite*, **15**(1), 27-34.
- Mayr, E. (1942) Systematics and the Origin of Species. *New York, Columbia University Press*.
- Meier, R., Shiyang, K., Vaidya, G. & Ng, P.K.L. (2006) DNA Barcoding and Taxonomy in Diptera: a tale of high Intraspecific Variability and Low Identification Success. *Systematic Biology*, **55** (5), 715-728.
- Mendel, G. (1907) Recherches sur les hybrides végétaux. *Bulletin Scientifiques de la France et de la Belgique*, t, XLI.
- Meyer, J.A. & Petersen, J.J. (1983) Characterization and seasonal distribution of breeding sites of stable flies and house flies (Diptera: Muscidae) on Eastern Nebraska feedlots and dairies. *Journal of Economic Entomology*, **76**, 103-108.
- Mihok, S. (2002) The development of a multipurpose trap (the Nzi) for tsetse and other biting flies. *Bulletin of Economical Research*, **92**, 385-403.
- Mihok, S., Kangethe, E.K. & Kamau, G.K. (1995 b) Trials of Traps and Attractants for *Stomoxys* spp. (Diptera, Muscidae). *Journal of Medical Entomology*, **32** (3), 283-289.
- Mihok, S., Maramba, O., Munyoki, E. & Kagoiya, J. (1995 a) Mechanical transmission of *Trypanosoma* spp. by African Stomoxyinae. *Tropical Medicine and Parasitology*, **46**, 103-105.
- Moreau, R. E. (1952) Africa since the Mesozoic: with particular reference to certain biological problems. *Proceedings of the zoological Society of London*, **121**, 869-913.
- Ramsamy, M. (1979) Studies of the large-scale rearing of the stable fly, *Stomoxys nigra* Macquart (Diptera : Muscidae). *Bulletin of Entomological Research*, **69**, 477-489.

- Richard, J.L. & Pier, A.C. (1966) Transmission of *Dermatophilus congolensis* by *Stomoxys calcitrans* and *Musca domestica*. *American Journal of Veterinary Research*, **27** (117), 419-423.
- Ross, H. H., Ross, C. A. & Ross, J. R. P. (1982) A textbook of entomology. John Wiley & Sons, New York. 666 pp
- Samways, M.J., Osborn, R., Hastings ,H. & Hattingh V. (1999) Global climate change and accuracy of prediction of species geographical ranges: establishment success of introduced ladybirds (Coccinellidae, *Chilocorus* spp.) worldwide. *Journal of Biogeography*, **26**, 795–812.
- Schofiels, S. and Brady, J. (1996) Circadian activity pattern in the stable fly, *Stomoxys calcitrans*. *Physiological Entomology*, **21**,159-163.
- Schofield, S. & Torr, S.J. (2002) A comparison of the feeding behaviour of tsetse and stable flies. *Medical and Veterinary Entomology*, **16**, 177-185.
- Simmonds, S.W. (1944). Observations on the biology of the stable fly in Florida. *Journal of Economic Entomology*, **37**, 680-686.
- Somme, L. (1961) On the overwintering of house flies (*Musca domestica* L.) and stable flies (*Stomoxys calcitrans* (L.)) in Norway. *Norsk Entomologisk Tidsskrift*, **11**, 191-223.
- Simpson, G.G. (1944) Tempo and mode in evolution. *Columbia University Press, New York*, 237 p.
- Smith, J.P., Hall, R.D. & Thomas, G.D. (1987) Field parasitism of the stable fly (Diptera: Muscidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **80** 391–397
- Sutherland, B. (1979) Some effects of temperature on the adults eggs and pupae of *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera:Muscidae). *Onderstepoort Journal of Veterinary Resaerch*, **46**, 223-227.
- Szalanski, A.L., Taylor, D.B. & Peterson, R.D. (1996) Population genetics and gene variation of stable fly populations (Diptera: Muscidae) in Nebraska. *Journal of Medical Entomology*, **33**, 413-420.
- Taylor, D.B., & Berkebile, D. (2006) Comparative efficiency of six Stable fly (Diptera) traps. *Journal of economical Entomology*, **99** (4),1415-1419.

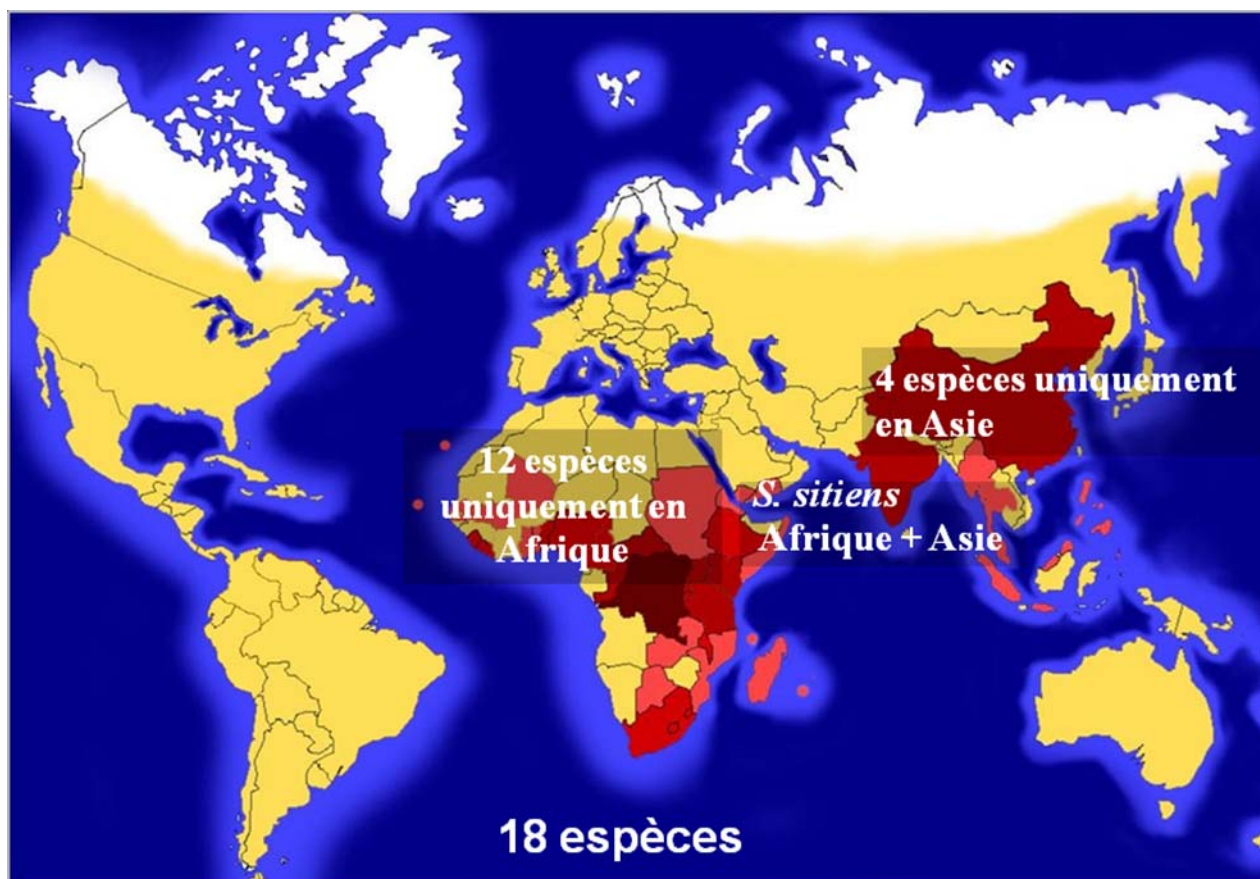
Thuiller, W., Lavorel, S. & Araújo, M. B. (2005) Niche properties and geographical extent as predictors of species sensitivity to climate change. *Global Ecology and Biogeography*, **14**, 347-357.

Williams, D.F. (1973) Sticky traps for sampling populations of *Stomoxys calcitrans*. *Journal of Economic Entomology*, **66**, 1279-1280.

Zumpt, F. (1973) The Stomoxyine biting flies of the world. Taxonomy, biology, economic importance and control measures. *Gustav Fischer Verlag, Stuttgart*, 175 pp.

Annexe

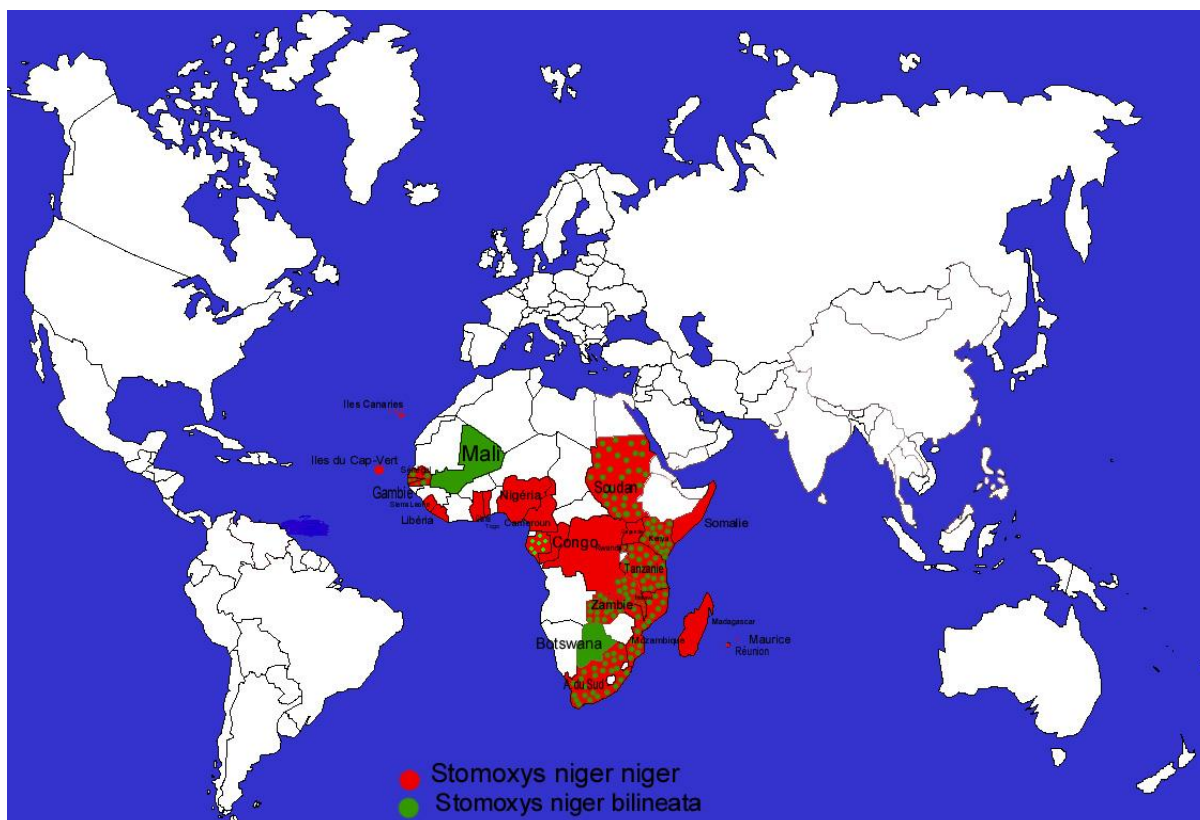
Annexe A : Cartes de distribution des *Stomoxys*



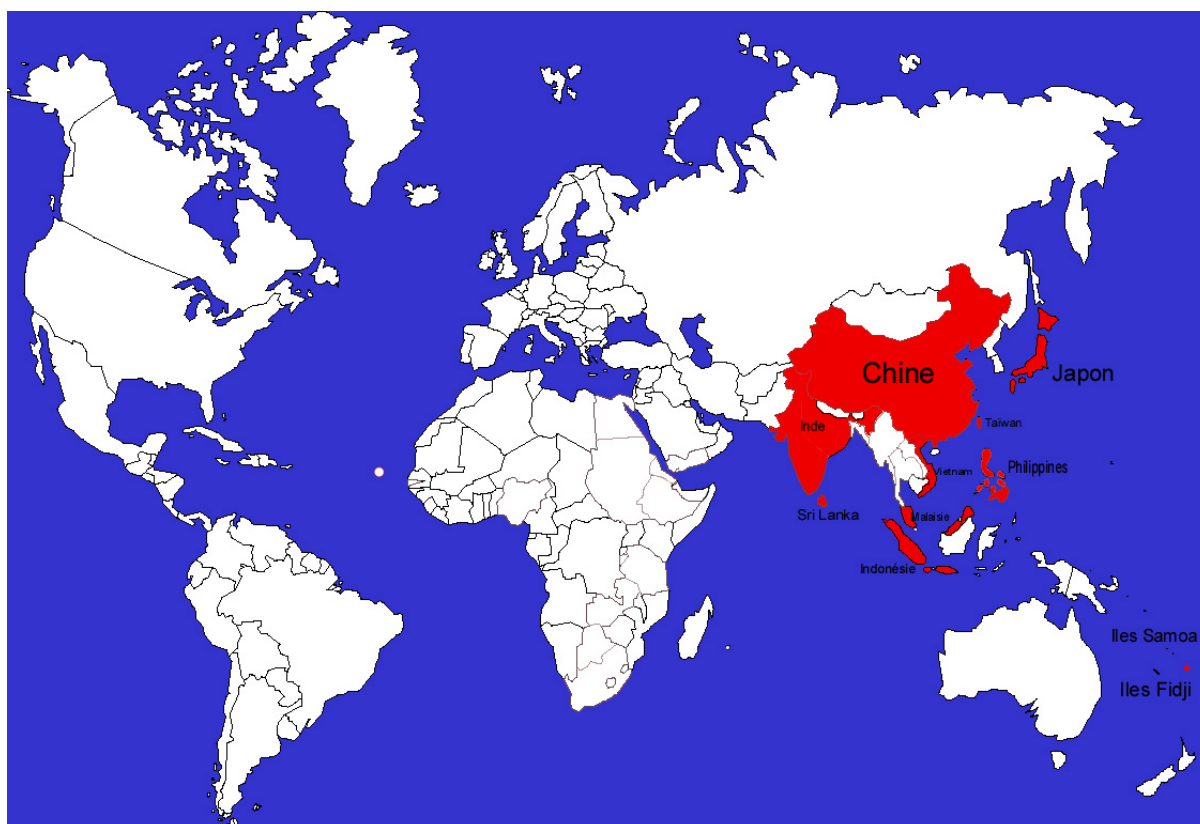
S. calcitrans

Distribution des espèces de *Stomoxys*

Annexe A (Suite)

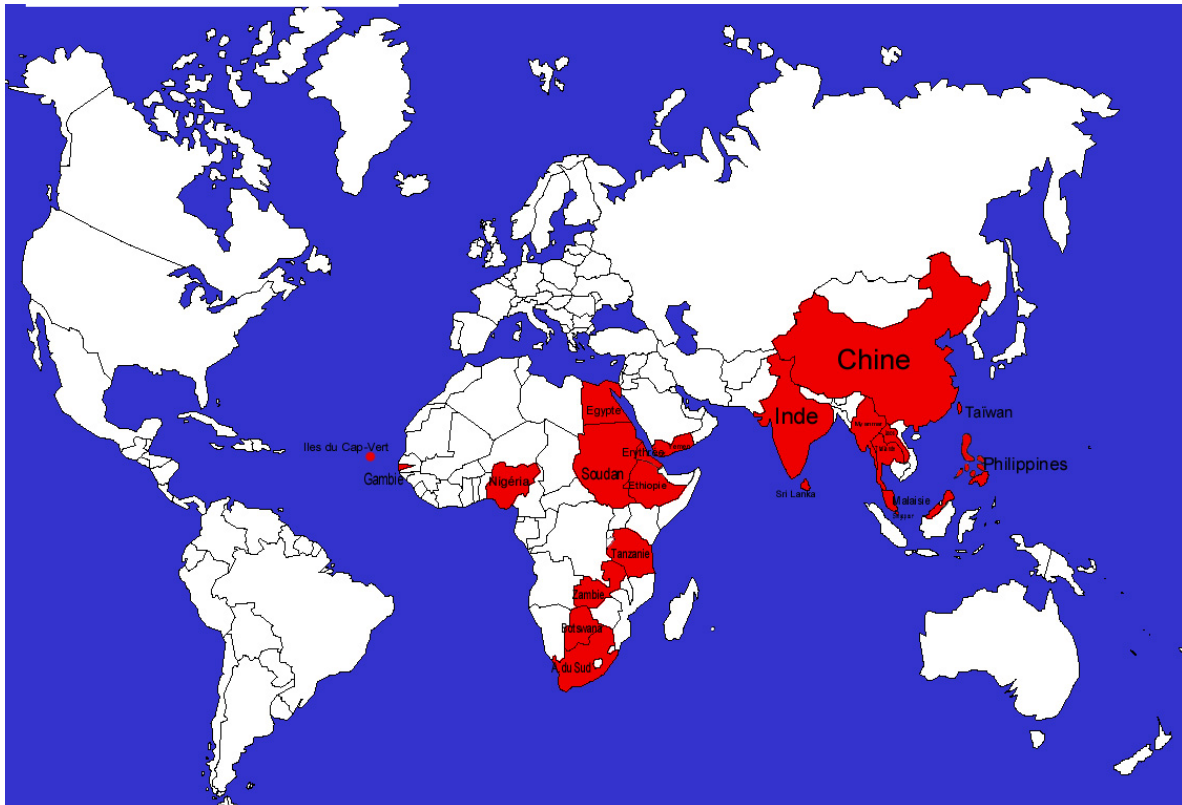


Distribution de *S. n. niger* et *S. n. bilineatus*



Distribution de *S. indicus*

Annexe A (Suite)

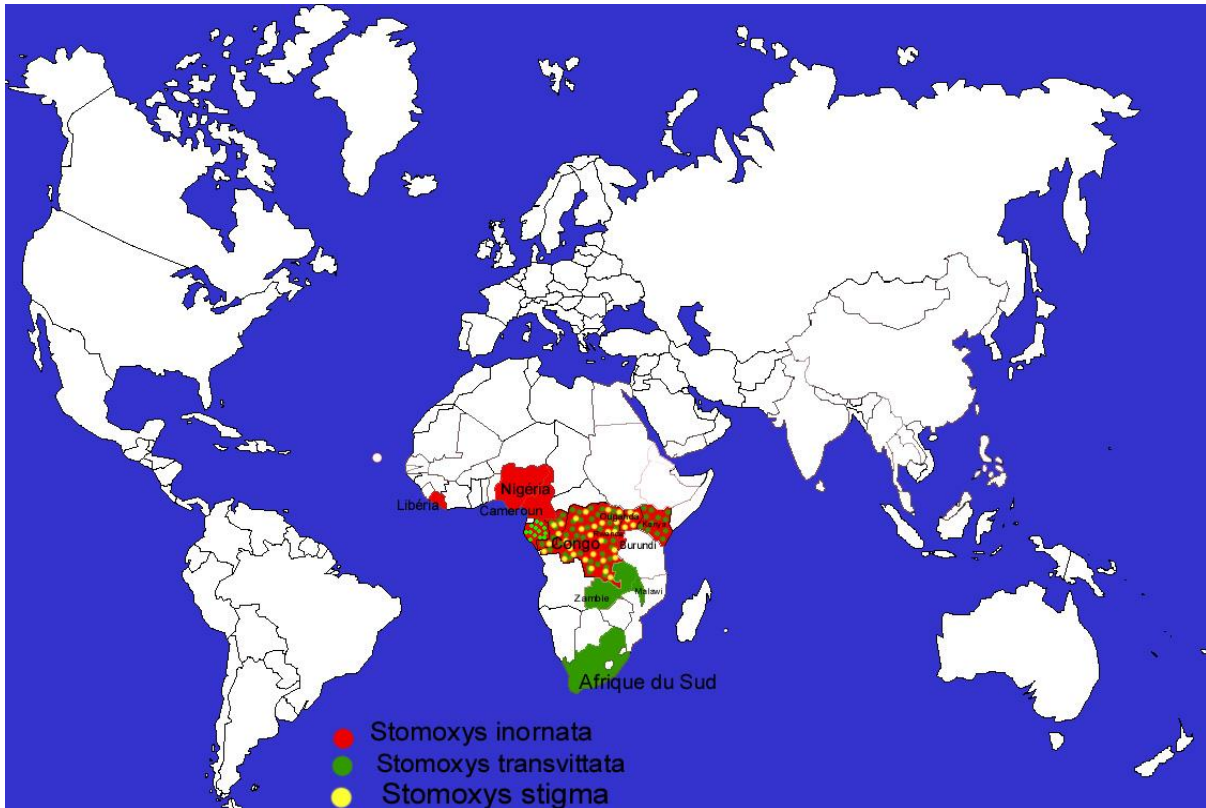


Distribution de *S. sitiens*

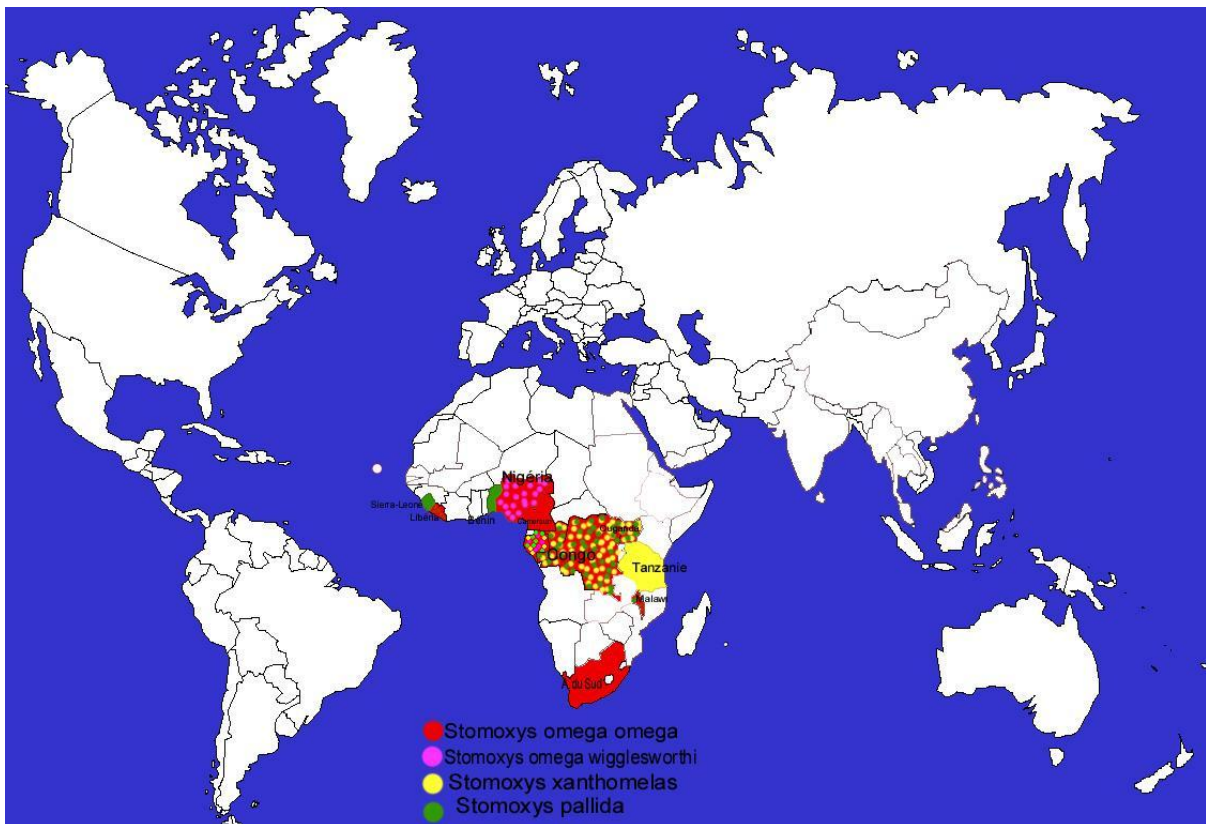


Distribution de *S. bengalensis*

Annexe A (Suite)



Distribution de *S. inornatus*, *S. transvittatus* et *S. stigma*



Distribution de *S. omega*, *S. xanthomelas* et *S. pallidus*

Annexe A (Suite)



Distribution de *S. varipes*

Annexe B :

Description de la répartition et de l'écologie des espèces connues de *Stomoxys* :

Espèces	Distribution (Zumpt, 1973)	Ecologie
<i>S. calcitrans</i> (Linnaeus)	Cosmopolite	Espèce anthropophile-
<i>S. bengalensis</i> Picard	Inde à Java	Milieu anthropisé
<i>S. indicus</i> Picard	Région orientale et territoires avoisinant le Paléarctique	Milieu anthropisé
<i>S. sitiens</i> Rondani	Régions éthiopienne et orientale	Milieu anthropisé
<i>S. niger</i> Macquart		
<i>S. niger niger</i>	Région éthiopienne et Madagascar	Milieu anthropisé
<i>S. niger bilineatus</i>	Région éthiopienne et Madagascar	Savane
<i>S. inornatus</i> Grünberg	Afrique tropicale	Forêt primaire
<i>S. omega</i> Newstead	Régions éthiopienne	Forêt primaire
<i>S. pallidus</i> Roubaud	Afrique tropicale	Forêt primaire
<i>S. transvittatus</i> Villeneuve	Afrique centrale et du sud	Forêt primaire
<i>S. xanthomelas</i> Roubaud	Congo- Tanzanie- Ouganda	Forêt primaire

LANDSCAPE, POPULATION STRUCTURE AND GENETIC DIVERSITY OF *STOMOXYS CALCITRANS*

DSOULI AYMES N.*, MAVOUNGOU J.F.** , DE STORDEUR E.* & DUVALLET G.*

Summary:

To investigate whether different landscapes could affect genetic diversity and structure of the cosmopolitan diptera *Stomoxys calcitrans*, populations from Gabon and southern France were studied using dominant amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. Gabon is characterized by a forested closed landscape, and southern France by an open Mediterranean landscape. The genetic diversity between Gabon and France populations did not differ significantly ($P > 0.05$). Contrary to our expectation, this study shows a moderate level of genetic differentiation between these two distant countries ($F_{st} = 0.0979$) and a low genetic structure among Gabonese and French populations ($F_{st} = 0.0291$ and 0.0275 respectively). This result could indicate the capacities of *S. calcitrans* populations to sustain a high level of gene flow, despite geographic distance and isolation.

KEY WORDS : *Stomoxys calcitrans*, population genetics, landscape ecology, AFLP.

Résumé :

IMPACT DU PAYSAGE SUR LA STRUCTURE DES POPULATIONS ET LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DE *STOMOXYS CALCITRANS*
Pour étudier l'impact du paysage sur la diversité génétique et la structure des populations de *Stomoxys calcitrans*, diptère cosmopolite, des populations du Gabon et du sud de la France ont été étudiées en utilisant des marqueurs AFLP (amplified fragment length polymorphism). Le Gabon est caractérisé par une forêt équatoriale, correspondant à un paysage fermé, alors que la zone d'étude dans le sud de la France correspond à un paysage largement ouvert. La diversité génétique entre les populations du Gabon et de France n'a pas montré de différence significative ($P > 0,05$). Contrairement à notre attente, cette étude a montré une différenciation génétique modérée entre les deux pays ($F_{st} = 0.0979$) et une structuration génétique faible au sein des populations du Gabon et de France ($F_{st} = 0.0291$ et 0.0275 respectivement). Ces résultats semblent indiquer la capacité des populations de *S. calcitrans* à maintenir un flux de gènes élevé, en dépit de la distance géographique et de l'isolement.

MOTS CLÉS : *Stomoxys calcitrans*, génétique des populations, paysage, écologie, AFLP.

The relationship between landscape pattern and population structure has become a major interest of many population genetics studies. Manel *et al.* (2003) coined the term of landscape genetics to describe combination of landscape ecology and population genetics. Thus, the landscape genetics approach provides information about the interaction between landscape features and microevolutionary processes such as gene flow, genetic drift and selection (Manel *et al.*, 2003; Storfer *et al.*, 2007). Although the common thought is that environmental and ecological changes exacerbate the risk of decline or extinction of species, it is also important to consider organisms that may be favoured by current environmental changes. Particularly, insects that have an immense ecological capability of adaptation and a great biological success in diverse environments (Behura, 2006; Mock *et al.*, 2007). A number of recent studies highlighted the effects of landscape characteristics on patterns of genetic popu-

lation structuring, including in insects (Keyghobadi *et al.*, 1999; Hunter, 2002).

Our team is presently working on stable fly populations. Stable fly, *Stomoxys calcitrans* (L) (Diptera, Muscidae), is a cosmopolitan insect that usually lives in close association with large domestic mammals and human beings (Zumpt, 1973). Both sexes are hematophagous. Their economic impact has been well established (Campbell *et al.*, 1987). These flies cause important economic losses in the cattle breeding, by their direct pathogenic effects (blood predation, irritation of the animals, reduction in immunizing defences, reduction in the production of milk...) and by their role in the transmission of certain pathogenic agents (Campbell *et al.*, 2001; D'Amico *et al.*, 1996). *S. calcitrans* historically has been a pest of livestock in confined operations but seldom of animals on pastures (Broce *et al.*, 2005). These flies are found essentially in rural areas near stables, slaughter houses, cattle markets and the rubbish dumps, locations related mainly to the presence of fermenting organic material (Batista *et al.*, 2005; Eesa & El-Sibae, 1993).

Describing insect diversity and ecology is important to understand their present distribution and can provide

* Département Écologie des Arthropodes, UMR 5175 CEFE, Université Paul-Valéry, Route de Mende, 34199 Montpellier cedex 5, France.

** Institut de Recherche en Écologie Tropicale (IRET), BP 13354, Libreville, Gabon.

Correspondence: Najla Dsouli Aymes. E-mail : dsouli2005@yahoo.fr

important information for effective management strategies. The purpose of our work is to evaluate the impact of landscape on population's structure and genetic diversity of this cosmopolitan species. We have had the opportunity to study populations from Gabon and from France. Gabon, in Africa, is characterised by an equatorial forested landscape. Contrary to Gabon, the Larzac area, located in southern France is characterized by a mediterranean karstic plateau and deforested landscape (Plagnes & Bakalowicz, 2001). Populations of *S. calcitrans* are present in both environments. Our hypothesis was that the equatorial forest in Gabon makes physical barriers between populations of flies living around isolated and distant villages.

The most commonly used molecular tools for landscape genetic studies are neutral hypervariable markers (amplified fragment length polymorphisms and microsatellites) (Storfer *et al.*, 2007). To conduct this study we choose to use the amplified fragment length polymorphism (AFLP) (Vos *et al.*, 1995). AFLP was selected over other techniques because it has been demonstrated to be a powerful method for the characterization of intraspecific polymorphism among populations (Krauss, 2000). This method is relatively inexpensive, requires no initial time investment associated with primer design and has the advantage of sampling variation throughout the entire genome (Bensch & Akesson, 2005; Mendelson & Shaw, 2005).

MATERIALS AND METHODS

STUDY SITES AND SAMPLE COLLECTION

Samples of *Stomoxys calcitrans* were collected in Gabon from four sites close to the following towns: Makokou, Libreville, Mouilla and Nzadié, and in France from three sites in Larzac area (Le Caylar, Luc and other small villages grouped together). Vavoua traps (Laveissière & Grébaud, 1990) were used for captures. Trapped flies were put into freezer to kill them. Then they were preserved in 95° ethanol and identified in the laboratory according to Zumpt (1973).

DNA EXTRACTION AND AFLP PROTOCOL

S. calcitrans were crushed with tungsten microballs and their DNA extracted using the DNeasy tissue Kit (QIAGEN).

AFLP analysis was performed essentially as described by Vos *et al.* (1995), using AFLP Core Reagent Kits (Invitrogen Life Technologies). The DNA of each sample was digested with the restriction enzymes *MseI* and *EcoRI*, 1.25 U each in a volume of 12.5 µl containing reaction buffer at 37 °C for 2 h, followed by a final step of 70 °C for 15 min. 12 µl of adapter/ligation solution

containing *EcoRI/MseI* adapters, 0.5 µl of T₄ DNA ligase were added to the digest DNA. The solution was incubated at 20 °C for 2 h. Following ligation, a first amplification was carried out with primers containing one selective nucleotide (cytosine and adenine for *MseI* and *EcoRI* primers, respectively), 20 µl pre-amp primer mix, 2.5 µl 10 × PCR buffer plus Mg and 0.5 µl Taq polymerase were added in a total volume of 25.5 µl. PCR was performed for 20 cycles, which consisted of 30 s at 94 °C, 1 min at 56 °C and 1 min at 72 °C in a PTC-100™ MJ Research Peltier thermocycler. The PCR products were diluted 10-fold with TE buffer. The second amplification was carried out with the selective primer pair: fluorescent-labelled *EcoRI*-GAGTGCCTACCATTGAC and unlabelled *MseI*: GATGAGTCCTGAGTAACTC (selective bases are in bold letters). The PCR mixture consisted of 5 µl of diluted preamplified DNA, 2 µl of 10 × PCR Buffer plus Mg, 0.8 µl of 20 mM dNTP mix, 0.2 µl of 10 µM/ml *EcoRI* primer, 0.2 µl of 10 µM/ml *MseI* primer and 0.1 µl Taq polymerase (5U/µl) in a total volume of 20 µl. The thermocycler program consisted of two segments. The first segment comprised 12 cycles with the annealing temperature decreased from 65 °C by 0.7 °C in each cycle: 30 s at 94 °C, 30 s at 65 °C to 57.3 °C and 1 min at 72 °C. The second segment consisted of 23 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 56 °C and 1 min at 72 °C.

For automated fragment analysis, 1.5 µl of selective PCR products were pooled on 15 µl of deionized formamide and 0.2 µl of Genescan-500Rox, an internal size standard (Applied Biosystems) and run on an ABI 3130 sequencer. Fragments were sized using GeneMapper® Software v.3.7 (Applied Biosystems). Bands used in scoring ranged in size from 100 to 500 bp. AFLP products were scored visually as discrete character states (present/absent).

POPULATION GENETIC ANALYSIS

Gene diversity was calculated after the estimation of allelic frequencies at each locus using a Bayesian method with nonuniform prior distribution of allele frequencies (Zhitovovsky, 1999) and assuming Hardy-Weinberg equilibrium implemented in the program AFLP-SURV (Vekemans *et al.*, 2002) with a predefined value of $F_{is} = 0$. The frequency of the null allele at each locus is computed from two numbers, the sample size and the number of individuals in the sample that lack the AFLP fragment. This method has been shown to generate nearly unbiased estimates of null allele frequencies in dominant marker systems (Zhitovovsky, 1999). After estimating allele frequencies, statistics of gene diversity and population genetic structure were computed according to Lynch & Milligan (1994). For each population, we calculated the number (NPL) and proportion (PLP) of polymorphic loci at 5 % level and

expected heterozygosity under Hardy-Weinberg proportions (Hj) (also called Nei's gene diversity). Additionally, AFLP-SURV uses the Lynch and Milligan (1994) method to assess the total population genetic structure by estimating total gene diversity (Ht), average gene diversity within populations (Hw) (analogous to Hs), average gene diversity between populations (Hb) (analogous to Nei's Dst), and finally Wright's Fst (Fst computed as Hb/Ht). These estimates were used, in turn, to calculate the average number of individuals that migrate to each population per generation by using the formula $Nm \cong (1-Fst)/4Fst$ (Wright, 1951). Nei's genetic distance was estimated after Lynch & Milligan (1994) and Pairwise Fst between populations was also calculated to assess genetic differentiation (significance assessed by 1,000 permutations).

RESULTS

A total of 114 *S. calcitrans* were analysed, including 88 individuals from four Gabonese populations and 26 from three French populations. The two AFLP primers combinations yielded a total of 322 unambiguously scorable bands for the Gabonese populations and 216 for the French populations. The proportion of polymorphic loci (PLP) ranged from 50 to 59.3 % for Gabonese populations and from 50.9 to 54.6 % in French populations. The expected heterozygosity (Hj) in Gabonese and French populations varies from 0.1408 to 0.1817 and from 0.1746 to 0.1988 respectively (Table I). The genetic diversity between Gabon and France did not differ significantly (Mann-Whitney U-test: PLP, $P = 0.6286$ and Hj, $P = 0.1143$) (Table I). Total gene diversity (Ht) and mean within population gene diversity (Hw) were higher for French than for

Gabonese populations (Ht = 0.1922 and 0.1610 ($P = 0.0238$) and Hw = 0.1867 and 0.1563 ($P = 0.0238$) respectively) (Table II). Average gene diversity among populations (Hb) was higher for Gabonese populations (Table II).

The smallest Nei's genetic distance value was obtained between the populations from Makokou and Libreville (0.0024). The largest distance was obtained between Mouilla and Nzadié (0.0077) (Table II).

A moderate level of genetic differentiation was found when all populations were compared ($Fst = 0.0727$). Pairwise Fst between populations ranged from 0.0139 (between Makokou and Libreville) to 0.0409 (Mouilla and Nzadié). The Fst value among French populations did not differ significantly than that among Gabonese populations ($P = 0.7143$) (Table II). However, Fst values between Gabonese and French populations ($Fst = 0.0979$) was significantly greater from those within populations ($P < 0.0001$).

Gene flow (Nm) value recorded within French popu-

Populations	Sample size	Polymorphic loci (percentage)	Hj
Gabon			
Makokou (Mk)	28	180 (55.9)	0.1565
Libreville (Lib)	19	161 (50)	0.1460
Nzadie (Nz)	19	191 (59.3)	0.1817
Mouilla (Mo)	22	168 (52.2)	0.1408
France			
Le Caylar (Cay)	15	113 (50.9)	0.1746
Luc (Lu)	5	114 (52.8)	0.1988
Remainder (Re)	6	118 (54.6)	0.1872

Table I. – Statistics of gene diversity within populations of *S. calcitrans*. Polymorphism expected heterozygosity (Hj) is calculated using Lynch & Milligan (1994).

	Ht	Hw	Hb	Nei's genetic distance	Fst	Nm
Between Gabonese populations			0.0047		0.0291	8.34
Mk/Lib	0.1534	0.1513	0.0021	0.0024	0.0139	17.73
Mk/Nz	0.1752	0.1691	0.0061	0.0070	0.0346	4.72
Mk/Mo	0.1523	0.1487	0.0036	0.0040	0.0236	10.34
Lib/Nz	0.1691	0.1639	0.0052	0.0058	0.0304	7.97
Lib/Mo	0.1474	0.1435	0.0040	0.0045	0.0270	9.00
Mo/Nz	0.1683	0.1613	0.0070	0.0077	0.0409	5.86
Between French populations			0.0053		0.0275	8.84
Cay/Lu	0.1926	0.1867	0.0058	0.0048	0.0302	8.02
Cay/Re	0.1845	0.1810	0.0036	0.0029	0.0193	12.7
Lu/Re	0.1994	0.1930	0.0064	0.0056	0.0322	7.51
Between Gabon-France						
	0.1456	0.1312	0.0144	0.0166	0.0979	2.3

Table II. – Differentiation between *S. calcitrans* populations and genetic structure. Calculations performed with AFLP SURV 1.0 (Vekemans *et al.*, 2002).

lations was similar to that found between Gabonese populations (Mann-Whitney U-test: $P = 0.904$).

DISCUSSION

We have studied the genetic diversity of *S. calcitrans* in two different landscapes: equatorial forest in Gabon and deforested open field in France. According to our AFLP markers result, genetic differentiation was not different between Gabon and France. The F_{st} values (< 0.05) recorded within Gabonese populations and within French populations suggest a low level of genetic differentiation between these stable fly populations. Moreover, F_{st} values between Gabon and France (0.0979) indicate a moderate genetic differentiation. Low Nei's genetic distances confirm the lack of differentiation between populations. Furthermore, the values of N_m indicated high levels of gene flow occurring between all populations, independently of the scale.

Ecological evidence suggests that stable flies are strongly vagile, dispersing far and wide (Eddy *et al.*, 1962). These flies have great flight capacities and certain studies (Bailey *et al.*, 1979; Hogsette *et al.*, 1987) mention surprising displacement distances (several hundred kilometers), in search of a blood meal.

A PCR-RFLP analysis carried out by Szalanski *et al.* (1996) on *S. calcitrans* populations from Nebraska, Canada and Texas shows the same low differentiation. They recorded Nei genetic distances ranging from 0.000 to 0.0067. The number of migrants and F_{st} between Canadian and Kerrville (Texas) populations were respectively 3.48 individuals per generation and 0.067. Moreover, using microsatellite markers, Gilles *et al.* (2007) reveal large levels of gene flow on La Réunion Island for *S. calcitrans* ($F_{st} = 0.02$) despite the natural geographic barriers. As well, he demonstrated no genetic structuration for *S. niger* populations on this island ($F_{st} = 0$).

Recently, Marquez *et al.* (2007) studied the phylogeography of stable fly using mitochondrial COI and r16S, shows that countrywide pairwise estimates of genetic differentiation (G_{st}) varied from 0.08 (Kenya and Ivory Coast) to 0.71 (United Kingdom and Brazil) and that differentiation among six Nearctic populations was about 0.09. They also found that nucleotide diversities observed within and among regions were similar. Mitochondrial variation noted by Marquez *et al.* (2007) indicates greater indices of genetic differentiation than microsatellites record by Gilles *et al.* (2007) and even than our AFLP results. This corroborates Krafur *et al.* (2005) results, which prove a greater mitochondrial differentiation than microsatellites in the house fly. So, the degree of population structuring in stable flies can be compared with that reported in other invasive,

colonizing muscoid fly species. Comparing studies made by Cummings & Krafur (2005) on house fly, Cummings *et al.* (2005) on face fly and Marquez *et al.* (2007) on stable fly, a substantial differentiation degree of population structuration has been shown using mitochondrial markers. However, studies on gene diversity at polymorphic loci for muscoid diptera in North America show less genetic diversity in *S. calcitrans* than *Musca domestica*, *M. autumnalis* and *Heamatobia irritans* ($H_e = 0.182, 0.367, 0.305$ and 0.328 respectively) (Krafur, 1993). These speculations are explained by the fact that the mitochondrial genome has a set of characteristics (uniparentally inherited, homoplasic and non recombining) which makes it more sensitive to demographic phenomena than the nuclear genome (Avise, 2004). Moreover, as dominant marker, AFLP complicates heterozygosity analysis (Bleas *et al.*, 1998). Finally, for *S. calcitrans* the different landscapes observed in Gabon and in southern France do not show any influence on the genetic differentiation of populations, using AFLP markers. Further study on this topic should combine both mitochondrial and nuclear markers.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study has been funded by the Agence Nationale de la Recherche (Projet ANR-06-BDIV-14 IFORA: *African forest islands: model for a new approach to the dynamics of structuring of biodiversity*) and by European Union (Projet Fonds Européen de Développement 8 ACP GA 009 (PSVAP – Composante II Makokou, CNPN-MESRIT-U.E./IRET-CIFOR).

REFERENCES

- AVISE J.C. Molecular markers, natural history and evolution, 2nd. Ed., Sunderland MA/Sinauer Associates, 2004, 684 p.
- BAILEY D.L., WHITFIELD T.L. & SMITH B.J. Flight and dispersal of the stable fly. *Journal of Economic Entomology*, 1979, 66, 410-411.
- BATISTA Z.R., LEITE R.C., OLIVEIRA P.R., LOPES C.M.L. & BORGES L.M.F. Populational dynamics of *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus) (Diptera: Muscidae) in three biocenosis, Minas Gerais, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 2005, 130, 343-346.
- BEHURA S.K. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. *Molecular Ecology*, 2006, 15, 3087-3113.
- BENSCH S. & ÅKESSON M. Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals? *Molecular Ecology*, 2005, 14, 2899-2914.
- BLEARS M.G., DE GRANDIS S.A., LEE H. & TREVORS J.T. Amplified Fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 1998, 21, 99-114.

- BROCE A.B., HOGSETTE J. & PAISLEY S. Winter feeding sites of hay in round bales as major developmental sites of *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) in pastures in spring and summer. *Journal of Economic Entomology*, 2005, 98, 2307-2312.
- CAMPBELL J.B., BERRY I.L., BOXLER D.J., CLANTON D.C. & DEUTSCHER G.H. Effects of stable fly (Diptera: Muscidae) on weight gain and feed efficiency of feedlot cattle. *Journal of Economic Entomology*, 1987, 80, 117-119.
- CAMPBELL J.B., SKODA S.R., BERKERILE D.R., BOXLER D.J., THOMAS J.D., ADAMS D.C. & DAVIS R. Effects of stable flies (Diptera: Muscidae) on weight gains of grazing yearling cattle. *Journal of Economic Entomology* 2001, 94, 780-783.
- CUMMINGS M.A., MOON R.D. & KRAFSUR E.S. North American face flies old World origins: mitochondrial evidence. *Medical and veterinary Entomology*, 2005, 19, 48-52.
- CUMMINGS M.A. & KRAFSUR E.S. Spatial diversity in mitochondrial *Cytochrome C Oxidase* in house flies. *Medical and Veterinary Entomology*, 2005, 19, 53-59.
- D'AMICO F., GOUTEUX J.P., LE GALL F. & CUISANCE D. Are stable fly (Diptera: Stomoxyinae) vectors of *Trypanosoma vivax* in the central Africa Republic. *Veterinary Research*, 1996, 27, 161-170.
- DIDHAM R.K. The influence of edge effects and forest fragmentation on leaf litter invertebrates in Central Amazonia, in: Tropical Forest Remnants. Ecology, Management, and Conservation of Fragmented Communities. Laurance W.F. & Bierregaard R.O. Jr (eds), The University of Chicago Press, Chicago, IL, 1997, 55-70.
- EDDY G.H., ROTH A.R. & PLAPP F.W. Studies on the flight habitats of some marked insects. *Journal of Economic Entomology*, 1962, 55, 603.
- EESA N.M. & EL-SIBAE M.M. Population dynamics of some synanthropic fly species in different habitats in Buraydah, Saudi Arabia. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 1993, 23, 133-140.
- GILLES J., LITRICO I., TILLARD E. & DUVALLET G. Genetic structure and gene flow along an altitudinal gradient among two Stomoxyine species (Diptera: Muscidae) on La Réunion Island. *Journal of Medical Entomology*, 2007, 44, 433-439.
- HOGSETTE J.A., RUFF J.P. & JONES C.J. Stable fly and control in northwest Florida. *Journal of Agricultural Entomology*, 1987, 4, 1-11.
- HUNTER M.D. Landscape structure, habitat fragmentation and the ecology of insects. *Agricultural and Forest Entomology*, 2002, 4, 159-166.
- KEYGHOBADI N., ROLAND J. & STROBECK C. Influence of landscape on population genetic structure of the alpine butterfly *Parnassius smintheus* (Papilionidae). *Molecular Ecology*, 1999, 8, 1481-1495.
- KRAFSUR E.S. Allozyme variation in stable flies (Diptera: Muscidae). *Biochemical Genetics*, 1993, 31, 231-239.
- KRAFSUR E.S., CUMMINGS M.A., ENDSLEY M.A., MARQUEZ J.G. & NASON J.D. Geographic differentiation in the house fly estimated by microsatellite and mitochondrial variation. *Journal of Heredity*, 2005, 96, 502-512.
- KRAUSS S.L. Accurate gene diversity estimates from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Molecular Ecology*, 2000, 9, 1241-1245.
- LAVESSIÈRE C. & GRÉBAUT P. The trapping of tsetse flies (Diptera: Glossinidae). Improvement of a model: the Vavoua trap. *Tropical Medicine and Parasitology*, 1990, 41, 185-192.
- LYNCH M. & MILLIGAN B.G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, 1994, 3, 91-99.
- MANEL S., SCHWARTZ M.K., LUIKART G. & TABERLET P. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, 2003, 18, 189-197.
- MARQUEZ J.G., CUMMINGS M.A. & KRAFSUR E.S. Phylogeography of stable fly (Diptera: Muscidae) estimated by diversity at ribosomal 16S and *Cytochrome Oxidase I* mitochondrial genes. *Journal of Medical Entomology*, 2007, 44, 998-1008.
- MENDELSON T.C. & SHAW K.L. Use of AFLP markers in surveys of arthropod diversity. *Methods in Enzymology*, 2005, 395, 161-177.
- MOCK K.E., BENTZ B.J., O'NEILL M., CHONG J.P., ORWIN J. & PFRENDER M.E. Landscape-scale genetic variation in a forest outbreak species, the mountain pine beetle (*Dendroctonus ponderosae*). *Molecular Ecology*, 2007, 16, 553-568.
- PLAGNES V. & BAKALOWICZ M. The protection of karst water resources: the example of the larzac plateau (south of France). *Environmental Geology*, 2001, 40, 349-358.
- STORFER A., MURPHY M.A., EVANS J.S., GOLDBERG C.S., ROBINSON S., SPEAR S.F., DEZZANI R., DELMELLE E., VIERLING L. & WAITS L.P. Putting the "landscape" in landscape genetics. *Heredity*, 2007, 98, 128-142.
- SZALANSKI A.L., TAYLOR D.B. & PETERSON R.D. Population genetics and gene variation of stable fly populations (Diptera: Muscidae) in Nebraska. *Journal of Medical Entomology*, 1996, 33, 413-420.
- VEKEMANS X., BEAUWENS T., LEMAIRE M. & ROLDAN-RUIZ I. Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Molecular Ecology*, 2002, 11, 139-151.
- VOS P., HOGERS R., BLEEKER M. *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23, 4407-4417.
- WRIGHT S. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 1951, 15, 323-354.
- ZHIVOTOVSKY L.A. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Molecular Ecology*, 1999, 8, 907-913.
- ZUMPT F. The Stomoxyinae biting flies of the world. Taxonomy, biology, economic importance and control measures. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1973, 175 p.

Reçu le 1^{er} août 2008

Accepté le 10 décembre 2008

RÉSUMÉ

Contribution à la phylogénie du genre *Stomoxys* (Diptera, Muscidae) et à la phylogéographie de *Stomoxys calcitrans* (L. 1758)

Le genre *Stomoxys* comprend 18 espèces reconnues (Zumpt, 1973), dont seule *Stomoxys calcitrans* est devenue cosmopolite. L'analyse phylogénétique montre la paraphylie du genre *Stomoxys*, due à l'inclusion de *Prostomoxys saegerae* dans le groupe. Les constructions phylogénétiques présentent trois clades distincts, qui correspondent bien à la biogéographie. L'émergence basale de *S. indicus* suggère une origine Orientale du genre *Stomoxys* vers la fin de l'Oligocène. La divergence moléculaire, estimée à 16.3 millions d'années, entre *S. niger niger* et *S. niger bilineatus* propose l'élévation de ces deux sous-espèces au rang d'espèces.

L'étude phylogéographique de *S. calcitrans* montre la présence d'une lignée Orientale bien différenciée du reste. Les indices de diversité présument l'existence de deux zones de refuge. La première zone serait orientale, dont la recolonisation est limitée. La deuxième zone est probablement africaine, et a permis la recolonisation des autres régions. Le temps d'expansion de *S. calcitrans* est vraisemblablement lié au processus de domestication et/ou à la dernière période de glaciation.

DISCIPLINE (CNU) : Biologie des Populations et Écologie

MOTS- CLÉS

- | | |
|-----------------------------------|-------------------------|
| 1: Relations phylogénétiques | 5: Horloge moléculaire |
| 2: Morphologie | 6: Espèce anthropophile |
| 3: ADN mitochondrial et nucléaire | 7: Phylogéographie |
| 4: <i>Stomoxys sp.</i> | 8: Temps d'expansion |

Département de Biologie / Université Paul Valéry-Montpellier III. UMR 5175 CEFE (Centre d'Ecologie fonctionnelle et évolutive). Equipe : Ecologie des arthropodes dans les agroécosystèmes méditerranéens. Route de Mende, 34199 Montpellier Cedex 5 – France.

Contribution to the phylogeny of *Stomoxys* (Diptera: Muscidae) and to the phylogeography of *Stomoxys calcitrans* (L. 1758)

The *Stomoxys* genus includes 18 recognized species (Zumpt, 1973), only *Stomoxys calcitrans* became cosmopolitan. The phylogenetic analysis shows the *Stomoxys* paraphyly, due to the inclusion of *Prostomoxys saegerae* in the group. Phylogenetic constructions present three distinct clades, which correspond to the biogeography. The basal emergence of *S. indicus* suggests an Oriental origin of the *Stomoxys* genus, around the end of the Oligocene. The molecular divergence, estimated at 16.3 million years, between *S. niger niger* and *S. niger bilineatus* proposes the rise of these two subspecies to the rank of species.

S. calcitrans phylogeographic study shows the presence of an Oriental lineage differentiated from the remainder. The diversity indices suppose the existence of two refugia. The first one would be in the Oriental region, with restricted recolonisation. The second one is probably African, and allowed the recolonisation of the other regions. The time expansion of *S. calcitrans* is probably related to the process of domestication and/or to the last glaciation period.

KEY-WORDS:

- | | |
|----------------------------------|---------------------------|
| 1: Phylogenetic relationships | 5: Molecular clock |
| 2: Morphology | 6: Anthropophilic species |
| 3: Mitochondrial and nuclear DNA | 7: Phylogeography |
| 4: <i>Stomoxys sp.</i> | 8: Expansion time |