



HAL
open science

Écologie des Tabanidae en zones pastorales méditerranéennes et perspectives de lutte

Frédéric Baldacchino

► **To cite this version:**

Frédéric Baldacchino. Écologie des Tabanidae en zones pastorales méditerranéennes et perspectives de lutte. Sciences agricoles. Université Paul Valéry - Montpellier III, 2013. Français. NNT : 2013MON30025 . tel-00942818

HAL Id: tel-00942818

<https://theses.hal.science/tel-00942818>

Submitted on 6 Feb 2014

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par l'Université Paul-Valéry-Montpellier 3

**Préparée au sein de l'école doctorale Territoires, Temps,
Sociétés et Développement - ED 60
Et de l'unité de recherche UMR 5175 CEFE-CNRS**

Spécialité : Écologie et Biologie des Populations

Présentée par Frédéric BALDACCHINO

Sous la direction de Pierre JAY-ROBERT

**ÉCOLOGIE DES TABANIDAE EN ZONES
PASTORALES MÉDITERRANÉENNES ET
PERSPECTIVES DE LUTTE**

Soutenu le 22 novembre 2013 devant le jury composé de

M. Patrick GUERIN, Directeur de recherche, Université de Neuchâtel	Rapporteur
M. Jérémie BOUYER, Chargé de recherche, CIRAD UMR CMAEE	Rapporteur
M. Didier FONTENILLE, Directeur de recherche, IRD MIVEGEC	Examineur
M. Michel FRANCO, Professeur, ENVT Laboratoire de Parasitologie	Examineur
M. Claude MIAUD, Directeur d'étude, EPHE CEFE	Examineur
M. Pierre JAY-ROBERT, Maître de conférences, UMR 5175 CEFE	Directeur

Remerciements

En premier lieu, mes remerciements vont à mon directeur de thèse, Pierre Jay-Robert, qui m'a accordé sa confiance et m'a guidé au bout de ce projet. Merci de m'avoir laissé une grande liberté tout au long de ce travail.

Je tiens également à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer cette thèse. Merci au Professeur Patrick Guerin, à Jérémie Bouyer, au Professeur Michel Franc, à Claude Miaud et à Didier Fontenille pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail. C'est un honneur de vous compter dans ce jury.

Merci aux membres de mon comité de thèse de m'avoir accompagné pendant ces trois années. Merci à Laurent Dormont, Didier Rochat, Philippe Jacquet, Thomas Balenghien et au Professeur Gérard Duvallat pour leurs critiques et leurs remarques toujours pertinentes. Gérard, merci pour ton enthousiasme au quotidien.

Merci à Michel Martinez qui m'a formé à l'identification des Tabanidae. Merci pour son accueil au CBGP.

Merci à l'équipe de la PACE et plus particulièrement à Bruno Buatois pour sa disponibilité et son aide technique très précieuse.

Merci aux chercheurs qui ont collaboré à ce travail :

Ali Salem, Laboratoire de Parasitologie ENVY, pour l'élevage de stomoxes.

Claire Garros et Laëtitia Gardès, UMR CMAEE CIRAD, pour l'analyse des repas de sang.

Thibaut Martin et Emilie Delétré, UPR HORTSYS, pour les essais de vidéo-tracking.

Merci aux partenaires qui m'ont apporté leur soutien opérationnel sur le terrain :

Charles Balaguer, Directeur du parc animalier Les Angles.

Sylvain Drouës, Directeur du centre des Isards à Py.

Laurent Tatin, Chargé de mission de la RN des Coussouls de Crau.

Karine Geslot, Alain Mangeot et Claude Guisset, Conservateurs des RN de Jujols, Nohèdes et Mantet.

Merci aux chercheurs qui m'ont conseillé et aidé durant cette thèse : Hélène Guis, Steve Mihok, Jean-Claude Vala, Aurélien Besnard et Jean-Marie Bessière.

Merci aux étudiants qui ont travaillé avec moi sur ce projet. Merci à Angélique, Juliette, Coline, Lucile, Steve et Florian pour leur motivation et leur implication dans les manip labo mais aussi sur le terrain (parfois jusqu'à épuisement).

Merci à mon équipe « Écologie des arthropodes et changements globaux » d'avoir soutenu financièrement ce travail. Merci à Eric, Michel, Sylvain, Jérôme, Jean-Pierre, Nassera, Martine, Olivier, Lise, Lucia et Vittoria pour les échanges scientifiques et les pauses café (indispensables pour aller au bout de cette thèse).

Merci à Alfonsina, Céline et Thomas qui m'ont énormément soutenu jusqu'à la fin de cette thèse. Je leur souhaite beaucoup de réussite dans leur avenir.

Merci aux étudiants du CEFÉ pour les animations scientifiques, les goûters et les barbecues.

Merci aux amis du MIE pour cette belle expérience humaine. Merci à Amina, Maïmouna, Calvin, Emmanuel, Ibrahim, Hyacinthe, Abdoulaye, Claude, Benoît, Donald, Cheick, Ahmed, Marinely et Alexandra.

Merci à Thierry Baldet pour toute l'énergie qu'il a mise dans ce master.

Merci à Franc Remoué pour son accueil à Cotonou et les bons plats au bord de la piscine.

Merci à Christophe Paupy avec qui j'ai fait mes premiers pas dans la recherche.

Merci à aux amis de La Réunion, de Montpellier, de Franceville et d'ailleurs pour les moments passés ensemble. Merci à Thierry, Vincent, Samuel, Nicolas M., Nicolas P., Lise, Emilie, Laurent, Peggy, Vanina, Barthélémy...et tous ceux que je n'ai pas cités.

Merci aux amis du Grand Ouest pour tous ces bons souvenirs. Merci à David, Cathy, Damien, Karine, Laëtitia, Willy, Sébastien, Géraldine, Johnny, Cindy, Xavier, Nadège, Jean-Philippe, Manue, Pierre, Sophie, Denis, Pascale, Pascal, Christine, Viviane... et à tous les anciens collègues de la DSV49.

Merci aux amis de l'école véto de Toulouse pour ces années d'insouciance. Merci à Pat, Doogie, Max, Tony, Titi, Domi, Seb, Daubi, Benoît, Jéjé, Alba, Phiphine, Antoine, Jérémie, Deb, Felix, Gigi, Guigui, ...et j'en oublie.

Merci à mes anciens collègues de Laguiole, Marcillat-en-Combrailles, Mauriac, Lannemezan, Puy-Guillaume... et à ceux de Pezenas, Gignac et Clermont l'Hérault... que de chemins parcourus depuis.

Merci aux amis trailers pour les belles balades partagées, parfois dans la douleur mais toujours dans la bonne humeur. Merci à Sylvie, Jean-Marc, Claire, Franck, Sylvie, Bernard, Zabeth, Laurent, Marc, Pascal, Millie, Eric, Françoise, Florencio, Vincent, Philippe, Els, Jean-Christophe, Valérie...et tous les autres que j'ai croisé sur les courses.

Merci à Coco et JP de m'avoir offert une seconde famille à Montpellier.

Merci à Denise pour toute son affection. Je dédie cette thèse à René pour son esprit critique et sa curiosité insatiable.

Merci à ma famille pour son soutien et ses encouragements. Ils m'ont aussi aidé dans ce travail.

Merci à mes parents.

Résumé

Les zones pastorales méditerranéennes sont favorables à la diversité et à l'abondance des Tabanidae. Or, la réémergence de certaines maladies animales en Europe (e.g. besnoitiose bovine) a mis en avant leur rôle de vecteur mécanique. Cependant, la richesse biologique et la vulnérabilité des milieux pastoraux impliquent de réduire l'usage des insecticides contre les ectoparasites. Nous avons donc cherché à mieux connaître l'activité des taons dans les estives et à réfléchir à des méthodes de contrôle pratiques, efficaces et sélectives. Les pièges attractifs ou les répulsifs utilisables dans une stratégie « push-pull » impliquant de bien connaître l'olfaction des espèces cibles, nous nous sommes intéressés à la physiologie olfactive des taons et aux composés chimiques qui modulent les interactions avec leurs hôtes.

Les travaux sur l'écologie des taons dans les Pyrénées ont montré que l'exposition, l'altitude et la structure paysagère influençaient leur distribution spatio-temporelle, et que les conditions climatiques influençaient l'activité de piqûre des femelles. De plus, le caractère trophique opportuniste des femelles a été confirmé et le cerf est apparu comme un hôte de choix. Les réponses physiologiques et comportementales de *Tabanus bromius* et d'*Atylotus quadrifarius* aux odeurs d'urines et de leurs constituants ont révélé des différences de sensibilité olfactive entre ces deux espèces, la forte attractivité de l'urine de cheval s'expliquant probablement par la présence de composés volatiles qui agiraient en synergie. Pour conclure, nous proposons pour les troupeaux en estives des mesures de protection contre les taons et des perspectives de recherche pour ce groupe.

Mots clés : Tabanidae, pastoralisme, écologie, repas de sang, olfaction, électroantennographie, lutte anti-vectorielle intégrée

Abstract

Mediterranean pastoral areas are favourable to the diversity and abundance of Tabanidae. On the other hand, their role as mechanical vectors was highlighted by the re-emergence of animal diseases in Europe (e.g. Bovine Besnoitiosis). However, the biological richness and vulnerability of pastoral communities involve reducing the use of insecticides against ectoparasites. The objectives of this thesis were to better understand the activity of horse flies in summer pastures and to consider practical, efficient and selective pest control methods. A “push-pull” strategy using attractive traps and/or repellents implies a good knowledge of insect olfaction. Therefore, it was interesting to study the olfactory sensitivity of horse flies and semiochemicals that affect vector-host interactions.

In the Pyrenean mountains, work on the ecology of horseflies showed that their spatiotemporal distribution was influenced by exposure, altitude and landscape structure, and that the biting activity of females was related to climatic conditions. Moreover, the opportunistic feeding pattern of tabanids was confirmed with a preference for red deer. The physiological and behavioural responses of *Tabanus bromius* and *Atylotus quadrifarius* to urines volatiles and their constituents revealed differences between the olfactory sensitivity of these two species. The high attractiveness of aged horse urine is likely to be due to the mixture of various active compounds that may act synergistically. To conclude, pest control methods to protect cattle against horse flies in summer pastures and new research opportunities are discussed.

Key words: Tabanidae, pastoralism, ecology, blood meal, olfaction, electroantennography, integrated pest management

Table des matières

TABLE DES ILLUSTRATIONS	8
TABLE DES TABLEAUX	8
TABLE DES ENCARTS	8
LISTE DES ESPÈCES CITÉES DANS LA THÈSE AVEC LES NOMS COMPLETS (PAR ORDRE ALPHABÉTIQUE)	9
LISTE DES ARTICLES	10
COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	11
INTRODUCTION GENERALE	12
CHAPITRE 1 : LES TABANIDAE, NOTIONS D'ÉCOLOGIE ET IMPORTANCE VÉTÉRINAIRE	17
1.1. CYCLE DE DÉVELOPPEMENT	20
1.1.1. <i>Œufs</i>	20
1.1.2. <i>Larves et pupes</i>	20
1.1.3. <i>Adultes</i>	23
1.2. ÉCOLOGIE DES ADULTES	24
1.2.1. <i>Période d'activité</i>	24
1.2.2. <i>Recherche d'hôtes par les femelles</i>	25
1.3. IMPORTANCE MÉDICALE ET VÉTÉRINAIRE	29
1.3.1. <i>Nuisance</i>	29
1.3.2. <i>Agents pathogènes transmis</i>	31
1.3.3. <i>Clés de la transmission mécanique</i>	31
1.4. CONCLUSION CHAPITRE ET OBJECTIFS DE LA THÈSE	33
CHAPITRE 2 : LES TABANIDAE ET LEURS HÔTES DANS LES ESTIVES DE HAUTE-MONTAGNE	35
2.1. INFLUENCE DES VARIABLES ENVIRONNEMENTALES SUR LA DISTRIBUTION DES TABANIDAE	36
2.1.1. <i>Différentes variables environnementales</i>	36
2.1.2. <i>Distribution spatio-temporelle des Tabanidae dans les Pyrénées</i>	39
2.2. ACTIVITE DE PIQÛRE DES TAONS ET RÉACTIONS DE DÉFENSE DES HÔTES	56
2.2.1. <i>Activité de piqûre des taons</i>	56
2.2.2. <i>Réactions de défense des hôtes</i>	57
2.2.3. <i>Activité de piqûre des taons autour d'un troupeau de bovins en estive</i>	58
2.3. COMPORTEMENT TROPHIQUE DES TABANIDAE	85
2.3.1. <i>Des femelles plutôt opportunistes</i>	85
2.3.2. <i>Comportement trophique des taons dans les Pyrénées</i>	86
2.4. CONCLUSION CHAPITRE.....	99

CHAPITRE 3: TABANIDAE ET ODEURS D'HÔTES	101
3.1. SYSTÈME OLFACTIF CHEZ LES TABANIDAE	103
3.1.1. <i>Organisation du système olfactif périphérique chez les insectes</i>	103
3.1.2. <i>Fonctionnement du système olfactif</i>	104
3.1.3. <i>Caractéristiques des antennes de Tabanidae</i>	105
3.2. RÔLE DES KAIROMONES DANS LA LOCALISATION DES HÔTES VERTEBRÉS	107
3.2.1. <i>Principaux composés impliqués</i>	107
3.2.2. <i>Contraintes liées à l'expérimentation sur le terrain</i>	108
3.2.3. <i>Comparaisons des odeurs d'ongulés domestiques : exemple des urines</i>	110
3.2.4. <i>Sensibilité olfactive à l'octénol, aux phénols et à l'urine de cheval</i>	131
3.3. CONCLUSION CHAPITRE	155
CHAPITRE 4 : DISCUSSION GÉNÉRALE	156
4.1. NUISANCE DES TAONS EN ESTIVE ET IMPLICATIONS DANS LA TRANSMISSION DE LA BESNOITIOSE BOVINE	157
4.1.1. <i>Nuisance des taons en estive</i>	157
4.1.2. <i>Implications dans la transmission de la besnoitiose bovine</i>	160
4.2. PROTECTION DES TROUPEAUX DANS LES ESPACES NATURELS PROTÉGÉS	161
4.2.1. <i>Lutte biologique</i>	162
4.2.2. <i>Interventions sur les habitats</i>	163
4.2.3. <i>Application d'insecticides sur les animaux</i>	164
4.2.4. <i>Conduites d'élevage</i>	166
4.2.5. <i>Stratégie « push-pull »</i>	168
4.3. PERSPECTIVES	174
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	176
ANNEXES	191
ANNEXE 1. TRANSMISSION OF PATHOGENS BY <i>STOMOXYS</i> FLIES (DIPTERA, MUSCIDAE): A REVIEW	191
ANNEXE 2. AGENTS PATHOGÈNES ASSOCIÉS AUX TABANIDAE (D'APRES KRINSKY <i>ET AL.</i> 1976)	204
ANNEXE 3. CLÉ D'IDENTIFICATION DES TABANIDAE DE FRANCE (D'APRES CHVALA <i>ET AL.</i> 1972)	209
ANNEXE 4. RÉPONSES DES TABANIDAE AU CO ₂	235
ANNEXE 5. RÉPONSES DES TABANIDAE A DIFFÉRENTS ATTRACTIFS (AUTRES QUE LE CO ₂)	237
ANNEXE 6. THE REPELLENCY OF LEMONGRASS OIL AGAINST STABLE FLIES, TESTED USING VIDEO TRACKING	241

Table des illustrations

FIGURE 1. SPÉCIMENS DE COLLECTION DE TABANIDAE	17
FIGURE 2. ILLUSTRATION DU CYCLE DE VIE DES TABANIDAE	21
FIGURE 3. <i>P. APRICA</i> SUR UNE PATTE DE VACHE	30
FIGURE 4. VALLEE DE MANTET, PYRÉNÉES-ORIENTALES, FRANCE.....	40
FIGURE 5. PIÈGES NZI ET VAVOUA EN BINÔME.....	40
FIGURE 6. SITES D'ÉTUDE : VALLÉES A (LA MOULINE) ET B (MANTET).....	41
FIGURE 7. ANALYSE CANONIQUE DES CORRESPONDANCES (ACC) : REPRÉSENTATION DE LA DISTRIBUTION DES ESPÈCES EN FONCTION DES DIFFÉRENTES VARIABLES ENVIRONNEMENTALES	42
FIGURE 8. OBSERVATIONS DIRECTES DES ATTAQUES DE TAONS ET DES RÉACTIONS DE DÉFENSE DES BOVINS	59
FIGURE 9. PIÈGES NZI INSTALLÉS AUTOUR D'UN TROUPEAU DE BOVINS	59
FIGURE 10. RÉGRESSION LINÉAIRE SIMPLE : RELATION ENTRE LE PIÉGEAGE ET LES OBSERVATIONS DIRECTES DE <i>P. APRICA</i>	61
FIGURE 11. RÉGRESSION LINÉAIRE SIMPLE : RELATION ENTRE LE NOMBRE DE PIQÛRES DE TAONS ET LE NOMBRE DE COUPS DE PATTES	63
FIGURE 12. FEMELLES <i>T. BROMIUS</i> DISSÉQUÉES 24H, 48H, 72H ET 144H APRES GORGEMENT COMPLET	87
FIGURE 13. AMPLIFICATION D'ADN PAR (A) PCR MULTIPLEX ET (B) PCR SIMPLEX.....	88
FIGURE 14. ORIGINE DES REPAS DE SANG DE DIFFÉRENTES ESPÈCES DE TAONS COLLECTÉES DANS LES PÂTURES.....	90
FIGURE 15. ORIGINE DES REPAS DE SANG CHEZ DES FEMELLES <i>T. BROMIUS</i> DANS LE PARC ANIMALIER DES ANGLES....	91
FIGURE 16. SECTION LONGITUDINALE D'UNE SENSILLE BASICONIQUE DE <i>D. MELANOGASTER</i> (IN HANSSON & STENSMYR 2011)	103
FIGURE 17. ANATOMIE DU SYSTÈME OLFACTIF CHEZ LES INSECTES (D'APRÈS RAMDYA & BENTON 2010).....	104
FIGURE 18. ANTENNES DE TABANIDAE (IN CHVALA ET AL. 1972).....	105
FIGURE 19. SENSILLES DES ANTENNES DE <i>H. BIMACULATA</i> (IN IVANOV 2007).....	106
FIGURE 20. PIÈGE NZI SUR LE SITE DE « PEAU DE MEAU »	111
FIGURE 21. RÉPONSES EAG DE (A) <i>T. BROMIUS</i> ET (B) <i>A. QUADRIFARIUS</i>	132

Table des tableaux

TABLEAU 1 CLASSIFICATION DES TABANIDAE D'EUROPE D'APRÈS CHVALA ET AL. (1972)	18
--	----

Table des encarts

ENCART 1 : DIVERSITÉ MORPHOLOGIQUE DES TABANIDAE (CHVALA ET AL. 1972).....	19
ENCART 2 : ÉLEVAGE DE TAONS, DIFFICULTÉS ET BONNES PRATIQUES.....	22
ENCART 3 : ÉLECTROANTENNOGRAPHIE (EAG)	102
ENCART 4 : PIÈGES CONTRE LES TABANIDAE.....	173

Liste des espèces citées dans la thèse avec les noms complets (par ordre alphabétique)

- Aedes aegypti* (Linnaeus 1762)
Atylotus agrestis (Wiedemann 1828)
Atylotus fulvus (Meigen 1820)
Atylotus loewianus (Villeuneuve 1920)
Atylotus plebejus (Fallén 1817)
Atylotus quadrifarius (Loew 1874)
Atylotus rusticus (Linnaeus 1767)
Atylotus sublunaticornis (Zetterstedt 1842)
Bombyx mori Linnaeus 1758
Chrysops atlanticus (Pechuman 1949)
Chrysops caecutiens (Linnaeus 1758)
Chrysops callidus Osten Sacken 1875
Chrysops relictus Meigen 1820
Chrysops sepulcralis (Fabricius 1794)
Chrysops viduatus (Fabricius 1794)
Cryptotylus unicolor (Wiedemann, 1828)
Dasyrhamphis ater (Rossi 1790)
Drosophila melanogaster Meigen 1830
Glaucops hirsutus (Villers 1789)
Glossina morsitans morsitans (Wiedemann 1850)
Glossina pallidipes (Austen 1903)
Haematopota pluvialis (Linnaeus 1758)
Haematopota dissimilis Ricardo 1911
Heptatoma pellucens (Fabricius 1776)
Hybomitra aterrima (Meigen 1820)
Hybomitra auripila (Meigen 1820)
Hybomitra bimaculata (Macquart 1826)
Hybomitra caucasica (Enderlein 1925)
Hybomitra ciureai (Seguy 1937)
Hybomitra distinguenda (Verrall 1909)
Hybomitra epistates (Osten Sacken 1878)
Hybomitra expollicata (Pandelle 1883)
Hybomitra lundbecki Lyneborg 1959
Hybomitra lurida (Fallén 1817)
Hybomitra micans (Meigen 1804)
Hybomitra montana (Meigen 1820)
Hybomitra nigricornis (Zetterstedt 1842)
Leucotabanus annulatus (Say, 1823)
Lobesia botrana (Denis & Schiffermüller 1775)
Nemorius vitripennis (Meigen 1820)
- Pangonius haustellatus* Fabricius 1781
Pangonius micans Meigen 1820
Philipomyia aprica (Meigen 1820)
Philoliche zonata (Walker 1871)
Tabanus abactor Philip 1936
Tabanus atratus Fabricius 1775
Tabanus autumnalis Linnaeus 1761
Tabanus bifarius Loew 1858
Tabanus bovinus Linnaeus 1758
Tabanus bromius Linnaeus 1758
Tabanus cordiger Meigen 1820
Tabanus eggeri Schiner 1868
Tabanus exclusus Pandelle 1883
Tabanus fuscicostatus Hine 1906
Tabanus glaucopis Meigen 1820
Tabanus infestus Bogatchev & Samedov 1949
Tabanus lineola Fabricius 1794
Tabanus lunatus Fabricius 1794
Tabanus miki Brauer 1880
Tabanus maculicornis Zetterstedt 1842
Tabanus nemoralis Meigen 1820
Tabanus nigrovittatus Macquart 1847
Tabanus nipponicus Murdoch & Takahashi, 1969
Tabanus paradoxus Jaennicke 1866
Tabanus quatuornotatus Meigen 1820
Tabanus rupium (Brauer 1880)
Tabanus taeniola Palisot de Beauvois 1806
Tabanus tenuicornis (Enderlein 1932)
Tabanus tergestinus Egger 1859
Tabanus townsvilli Ricardo 1915
Tabanus unifasciatus Loew 1858
Tabanus regularis Jaennicke, 1866
Tabanus spectabilis Loew 1858
Tabanus spodopterus Meigen 1820
Tabanus sudeticus Zeller 1842
Tabanus sufis Jaennicke 1867
Silvius alpinus (Scopoli 1763)
Stomoxys calcitrans (Linnaeus 1758)
Stonemyia hispanica (Kröber 1921)
Theriopectes gigas (Herbst 1787)

Liste des articles

ARTICLE 1 :

Baldacchino F., Porciani A., Bernard C. & Jay-Robert P. (2013) Spatial and temporal distribution of Tabanidae in the Pyrenees Mountains: the influence of altitude and landscape structure. *Bulletin of Entomological Research*, in press. <http://dx.doi.org/10.1017/S0007485313000254>.

ARTICLE 2 :

Baldacchino F., Puech L., Manon S., Hertzog L. & Jay-Robert P. Biting behaviour of Tabanidae on cattle in high-altitude summer pastures. *Bulletin of Entomological Research*, under review.

ARTICLE 3 :

Baldacchino F., Gardes L., De Stordeur E., Jay-Robert P. & Garros C. Blood-feeding patterns of horse flies in the French Pyrenees. *Veterinary Parasitology*, in press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.10.009>.

ARTICLE 4 :

Baldacchino F., Cadier J., Porciani A., Buatois B., Dormont L. & Jay-Robert P. (2013). Behavioural and electrophysiological responses of females of two species of tabanids to volatiles in urine of different mammals. *Medical and Veterinary Entomology*, 27, 77-85.

ARTICLE 5 :

Baldacchino F., Manon S., Puech L., Buatois B., Dormont L. & Jay-Robert P. Olfactory responses of tabanids to octenol, phenols and aged horse urine. *Medical and Veterinary Entomology*, in press. doi: 10.1111/mve.12038.

ARTICLE 6 :

Baldacchino F., Muenworn V., Desquesnes M., Desoli F., Chaeroviriyaphap T. & Duvallat G. (2013) Transmission of pathogens by Stomoxys flies (Diptera, Muscidae): a review. *Parasite*, in press. <http://dx.doi.org/10.1051/parasite/2013026>.

ARTICLE 7 :

Baldacchino F., Tramut C., Salem A., Liénard E., Delétré E., Franc M., Martin T., Duvallat G. & Jay-Robert P. (2013) The repellency of lemongrass oil against stable flies, tested using video tracking. *Parasite* 2013, in press. <http://dx.doi.org/10.1051/parasite/2013021>.

Communications scientifiques

Communications orales

Baldacchino F., Manon S., Puech L., Dormont L., Buatois, B. & Jay-Robert P. : Sensibilité olfactive des taons (Diptera : Tabanidae) vis-à-vis de l'octénol, des phénols et de l'urine de cheval. In : *1^{ère} rencontre nationale des jeunes chercheurs en écologie chimique*. Montpellier, France. 5 juin 2013.

Baldacchino F. : Tabanidae en zone de montagne : interactions avec leurs hôtes et leur environnement. In : *Journée DGSE UMR5175 CEFE*. Montpellier, France. 22 Février 2013.

Posters

Baldacchino F., Manon S., Puech L., Dormont L., Buatois, B. & Jay-Robert P. : Chemical ecology for a better control of horse flies. In : *18^e Conference of the European Society of Vector Ecology*. Montpellier, France. 8-11 October 2012.

Baldacchino F., Cadier J., Porciani A., Dormont L., Buatois, B. & Jay-Robert P. : Are tabanids opportunistic blood-feeders ? In : *2nd Annual Meeting of the European PhD Network in « Insect Sciences »*. Tours, France. 7-11 November 2011.

Introduction générale

Le pastoralisme regroupe l'ensemble des activités d'élevage valorisant par un pâturage extensif les ressources fourragères spontanées des espaces naturels, pour assurer tout ou une partie de l'alimentation des animaux (AFP, 2013). En France, il concerne divers types d'animaux (ovins, bovins, caprins, équins) et divers types de milieux (estives de haute-montagne, parcours méditerranéens, milieux humides...). En 2000, 60 000 exploitations valorisent des surfaces pastorales avec un poids variable selon les massifs (51% des exploitations dans les Pyrénées) et selon les cheptels (12% du cheptel bovin) (Angéniol & Balloy 2012). Au fil des siècles, l'agriculture pastorale a façonné l'environnement naturel et entretenu la richesse des communautés d'espèces. Le pâturage extensif contribue considérablement au maintien de la biodiversité, en particulier le long des parcours méditerranéens (Myers *et al.* 2000) et sur les estives de haute-montagne (Mack *et al.* 2013). Une grande diversité d'espèces assure les fonctions et les services écosystémiques au sein des milieux « naturels » (Duffy 2009; Beynon *et al.* 2012). Les insectes, par exemple, assurent des fonctions de pollinisation (abeilles, bourdons, syrphes, coléoptères...), de prédation sur les ravageurs de plantes (coccinelles, syrphes...), et de décomposition de la matière fécale (coléoptères coprophages...) (Potts *et al.* 2006; Beynon *et al.* 2012; Woltz *et al.* 2012). Mais, la biodiversité est de plus en plus affectée par la perturbation des habitats, par les changements climatiques ou encore par les pollutions (Millenium Ecosystem Assessment 2005; Egri *et al.* 2013a). Les milieux pastoraux sont ainsi des espaces fragilisés où la biodiversité et le fonctionnement des écosystèmes sont aussi liés aux pratiques agricoles (intensification ou déprise, traitements vétérinaires...). Ces milieux font d'ailleurs l'objet de mesures de protection et de conservation au niveau national au travers des espaces naturels sensibles, des sites Natura 2000, des réserves naturelles ou encore des parcs nationaux, regroupés sous le terme d'espaces naturels protégés (Lefebvre & Moncorps 2010).

D'un point de vue sanitaire, les milieux pastoraux constituent des environnements à risques pour les animaux domestiques. La transmission d'agents pathogènes est favorisée entre animaux provenant d'exploitations différentes, mais aussi entre animaux domestiques et faune sauvage. Les ongulés sauvages, en particulier, très proches d'un point de vue phylogénétique et

écologique, peuvent être à l'origine de l'émergence de maladies infectieuses (Martin *et al.* 2011). De plus, de nombreux arthropodes ectoparasites peuvent affecter la santé du bétail soit par leur impact direct (nuisance, spoliation sanguine, lésions cutanées, baisse de productivité) soit par leur rôle de vecteur dans l'épidémiologie de certaines maladies (Colebrook & Wall 2004). Parmi les arthropodes ectoparasites, certains sont des parasites permanents comme les acariens, les poux ou les puces tandis que d'autres sont des parasites temporaires comme la plupart des diptères hématophages (moustiques, culicoïdes, simulies, tabanides, stomoxes) (Mehlhorn *et al.* 2010).

Plus spécifiquement, les stomoxes et les tabanides constituent une réelle nuisance pour le bétail et sont responsables de la transmission d'agents pathogènes (Krinsky 1976) (Annexes 1 et 2). Récemment, la réémergence de certaines maladies en Europe ainsi que l'introduction d'agents pathogènes exotiques ont mis en avant leur rôle de vecteurs mécaniques. Plusieurs foyers sporadiques d'anémie infectieuse des équidés se sont ainsi déclarés en Europe ces dix dernières années (Hans *et al.* 2012; Maresca *et al.* 2012). La Roumanie et l'Italie, qui sont les pays européens les plus touchés, ont dû mettre en place des programmes nationaux de surveillance. La besnoitiose bovine, maladie enzootique dans les Pyrénées et au Portugal avant 1990, s'est répandue jusqu'en Allemagne depuis les années 2000 avec une augmentation du nombre de cas enregistrés (Alvarez-García *et al.* 2013). Enfin, suite à l'importation de chameaux provenant des Îles Canaries, des foyers de *Trypanosoma evansi*, agent du surra, ont été détectés en France et en Espagne (Gutierrez *et al.* 2010). Pour tous ces foyers, l'implication des stomoxes et des tabanides dans la diffusion des maladies a été fortement suspectée.

Le genre *Stomoxys* regroupe 18 espèces dans le monde. *Stomoxys calcitrans* (également appelé mouche des étables ou mouche charbonneuse) est une espèce cosmopolite et la seule espèce de stomoxes présente en France métropolitaine. Les larves de stomoxes se développent dans le fumier ou le foin en décomposition. Les stomoxes sont ainsi très dépendants des animaux domestiques et sont essentiellement rencontrés à proximité des exploitations (Foil & Hogsette 1994). La famille des Tabanidae comprend 4300 espèces appartenant à 133 genres dans le monde (Mullen & Durden 2002). Il existe une centaine d'espèces en France. Leurs gîtes larvaires, très variés et très dispersés, sont indépendants du bétail. De plus, les animaux sauvages constituent une source de sang suffisante pour permettre la persistance des populations de taons en l'absence

de bétail. Les taons peuvent ainsi être une réelle nuisance pour les ongulés domestiques et sauvages dans les milieux agro-pastoraux.

Actuellement, la lutte contre ces diptères se limite souvent à l'usage d'insecticides appliqués sur les animaux ou sur les gîtes larvaires autour des exploitations. De telles mesures nécessitent de bien connaître le mode de développement et la période d'activité de ces insectes, mais ces connaissances sont souvent anciennes voire inexistantes. Il est nécessaire de mettre à jour ce type de données afin de préconiser des méthodes de contrôle efficaces et d'éviter l'apparition ou l'expansion de populations d'insectes résistants (Mehlhorn *et al.* 2010). Par ailleurs, les traitements insecticides mis en œuvre en plein champ peuvent se révéler toxiques pour l'entomofaune utile (Henry *et al.* 2012). Les pyréthrinoïdes sont largement utilisés sous forme de boucles auriculaires, en pour-on ou en pulvérisation dans la lutte contre les ectoparasites. Les résidus de ces molécules dispersés par simple contact (Gassner *et al.* 1997) ou excrétés dans les matières fécales sont toxiques pour les invertébrés de manière générale et tout particulièrement pour les espèces coprophiles (Wardhaugh 2005). Des études ont également reporté une toxicité pour la faune du sol et surtout pour la faune aquatique (Beynon 2012). L'usage de ces molécules doit ainsi être limité, notamment dans les espaces naturels protégés. Les futurs efforts de lutte doivent prendre en considération les effets directs et indirects sur l'environnement, ce qui implique des stratégies de contrôle sélectives (Peter *et al.* 2005). L'élaboration de dispositifs répulsifs d'une part et de pièges hautement spécifiques d'autre part (approche « push-pull ») peut constituer une alternative crédible (Cook *et al.* 2007).

La conjonction entre l'émergence de maladies vectorielles et la nécessité de préserver les milieux naturels des pollutions diffuses implique de mieux connaître la biologie et l'écologie des espèces vectrices et, en particulier, de mieux comprendre les relations entre ces espèces et leurs hôtes potentiels dans les habitats pastoraux. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi de focaliser notre travail sur les Tabanidae. Les taons sont des diptères d'assez grande taille facilement reconnaissables (motifs sur le corps, coloration des yeux). Du fait de leur mode de vie, ces insectes sont très familiers des agriculteurs et des personnes qui pratiquent des activités plein air (Mullen & Durden 2002). A l'échelle mondiale, les Tabanidae constituent une famille de diptères hématophages peu étudiée par comparaison avec d'autres familles comme les Culicidae, vecteurs

de nombreux agents de maladies humaines (paludisme, dengue...). En France, les connaissances sur ce groupe sont très limitées et aussi très anciennes puisque les principales études entomologiques ont été menées dans les années 1960-1970 par Leclercq (Leclercq 2009). Dans les milieux pâturés d'altitude, les connaissances se limitent à quelques inventaires faunistiques réalisés dans les Pyrénées et les Alpes (Leclercq 1971a, b). Pourtant, les conditions environnementales sont très contraignantes en montagne et de nombreuses études ont montré l'influence de l'altitude sur la distribution des insectes (McCoy 1990; Hodkinson 2005). On peut donc supposer que la distribution des insectes y sera complexe, influencée à la fois par l'hétérogénéité des habitats et par les déplacements des ongulés. Or, les principales données sur l'écologie des Tabanidae proviennent essentiellement d'études réalisées en plaine. Dans le premier chapitre, nous aborderons les notions importantes sur la biologie et le développement des Tabanidae, l'écologie des adultes et leur impact sur la santé humaine et vétérinaire. Ces notions sont nécessaires pour appréhender les contraintes existantes lors de l'étude de ces diptères, pour identifier les lacunes concernant cette famille et pour comprendre les objectifs de la thèse (Chapitre 1).

Les estives sont des milieux favorables à la diversité et l'abondance des Tabanidae du fait de la multiplicité des gîtes larvaires (rivières, lacs, tourbières, litière de forêt) et de la disponibilité en hôtes (ongulés domestiques et sauvages). En milieu tempéré, les adultes sont surtout abondants l'été. Chez les taons, seules les femelles sont hématophages avec une activité diurne. Elles possèdent une grande capacité de vol, ce qui leur permet de rechercher une source de sang sur un large périmètre (Konstantinov 1993). Les femelles utilisent des stimuli visuels et olfactifs pour localiser et identifier leurs hôtes (Gibson & Torr 1999). Leur piqûre est très douloureuse et leur repas de sang est souvent interrompu par les réactions de défense des animaux. Les femelles vont alors avoir un comportement de piqûre insistant pour compléter leur repas de sang soit sur le même individu soit sur un autre individu situé à proximité (Desquesnes *et al.* 2009). Elles sont ainsi de bons vecteurs mécaniques d'agents pathogènes. Connaître l'intensité des attaques et le comportement de piqûre des taons dans les milieux pastoraux est donc important pour comprendre leur niveau de nuisance et leur rôle de vecteurs (Magnarelli 1985), en particulier dans une zone endémique de besnoitiose bovine comme les Pyrénées (Jacquiet *et al.* 2010). L'un des enjeux de cette thèse est donc de mieux comprendre l'écologie des taons dans les estives

d'altitude et, plus spécifiquement, de caractériser la distribution des femelles adultes et leur activité de piqûre au cours de l'été en tenant compte à la fois de la diversité des habitats, de la présence des hôtes potentiels et du rythme journalier (Chapitre 2).

L'autre enjeu de notre travail concerne la compréhension des mécanismes olfactifs qui interviennent dans la localisation des hôtes. Les principales données sur les réponses des taons aux odeurs sont issues d'expérimentations menées sur le terrain en Afrique (Phelps & Vale 1976; Amsler & Filledier 1994; Djiteye *et al.* 1998), en Amérique du Nord (Mihok *et al.* 2006; Mihok & Mulye 2010) et en Europe de l'Est (Krčmar 2005a; Krčmar *et al.* 2006; Krčmar 2007; Krčmar *et al.* 2010). Plusieurs composés ou substances, comme l'octénol, certains phénols et les urines d'ongulés, ont montré une certaine attractivité. Il est aussi apparu que les réponses des taons à ces signaux olfactifs étaient variables d'une espèce à l'autre. L'identification des composés chimiques volatils qui conditionnent l'attractivité des hôtes est essentielle à la fois pour comprendre le degré de relation entre les différentes espèces de taons et leurs hôtes (préférences, caractère généraliste vs. spécialiste...) et pour améliorer l'efficacité des pièges utilisés pour la surveillance ou le contrôle des populations d'insectes (Takken & Knols 2010). Pour cela, nous avons étudié les réponses physiologiques des antennes de taons à différents stimuli olfactifs et nous avons comparé, sur le terrain, l'attractivité de kairomones (Chapitre 3).

On peut considérer que le contrôle des populations de taons est une gageure. D'une part, les gîtes larvaires, indépendants du bétail, sont nombreux, dispersés et difficiles à localiser ; d'autre part, les femelles adultes ont besoin de seulement quelques minutes sur un hôte pour se gorger et assurer le renouvellement des populations futures (Foil & Hogsette 1994). Plusieurs méthodes de lutte (outils chimiques, mécaniques ou biologiques, conduites d'élevages ou aménagements des habitats) ont déjà été testées dans le but de réduire les populations de taons et de diminuer leur nuisance pour l'homme ou le bétail. Cependant, compte-tenu de la diversité des espèces et des situations, il semble peu pertinent d'extrapoler les résultats obtenus dans un contexte déterminé à l'ensemble de la famille. Dans le dernier chapitre, nous mobiliserons donc l'ensemble de nos résultats afin de concevoir une stratégie de lutte et/ou de protection adaptée à des espaces naturels méditerranéens déjà fragilisés par les changements climatiques et la pression anthropique (Chapitre 4).

Chapitre 1 : Les Tabanidae, notions d'écologie et importance vétérinaire

En Europe, la famille des Tabanidae est représentée par 3 sous-familles : Pangoniinae, Chrysopsinae et Tabaninae (Tableau 1). Environ 180 espèces sont connues parmi 14 genres : *Pangonius*, *Stonemyia*, *Chrysops*, *Nemorius*, *Silvius*, *Philipomyia*, *Dasyrhamphis*, *Atylotus*, *Theriopectes*, *Hybomitra*, *Tabanus*, *Heptatoma*, *Haematopota* et *Glaucops* (Chvála *et al.* 1972). La classification des Tabanidae d'Europe a été revue par Chvála *et al.* (1972).

La France compte plus de la moitié des espèces présentes en Europe (près d'une centaine d'espèces appartenant à 13 genres) avec des espèces très communes mais aussi des espèces plus circonscrites aux régions nordiques ou méridionales. Le sud de la France, en particulier, propose une grande diversité de milieux (steppe, zones humides, montagnes) favorables aux espèces méditerranéennes mais aussi aux espèces d'altitude.

Les Tabanidae sont des diptères de taille variable plutôt grande (6 à 30 mm) avec une apparence souvent colorée, en particulier les yeux. Les principaux critères morphologiques sont détaillés dans l'encart 1. Cette famille montre une grande diversité de taille et d'aspect (Figure 1). Afin de faciliter le travail d'identification, nous avons simplifié les clés de Chvála *et al.* (1972) en excluant les espèces n'ayant jamais été observées en France (Annexe 3).



Figure 1. Spécimens de collection de Tabanidae. Ces espèces illustrent la diversité morphologique des taons. De gauche à droite : *T. sudeticus*, *H. expollicata*, *T. bromius*, *C. caecutiens* et *H. pluvialis* (F. Baldacchino, 2013)

Tableau 1 Classification des Tabanidae d'Europe d'après Chvála *et al.* (1972)

Taxon	Principales espèces	Distribution
Sous-famille Pangoniinae		
Tribu Pangoniini		
Genre <i>Pangonius</i>	<i>P. micans</i> , <i>P. haustellatus</i>	Région méditerranéenne
Genre <i>Stonemyia</i>	<i>S. hispanica</i> [†]	Espagne
Sous-famille Chrysopsinae		
Tribu Chrysopsini		
Genre <i>Chrysops</i>	<i>C. caecutiens</i> , <i>C. relictus</i> , <i>C. viduatus</i>	Europe
Genre <i>Silvius</i>	<i>S. alpinus</i>	Europe
Genre <i>Nemorius</i>	<i>N. vitripennis</i>	Région méditerranéenne
Sous-famille Tabaninae		
Tribu Tabanini		
Genre <i>Therioplectes</i>	<i>T. gigas</i>	Europe
Genre <i>Hybomitra</i>	<i>H. lundbecki</i> , <i>H. ciureai</i> , <i>H. distinguenda</i> , <i>H. bimaculata</i> , <i>H. montana</i> <i>H. auripila</i> , <i>H. micans</i> , <i>H. lurida</i>	Europe Nord de l'Europe et régions montagneuses du centre et du sud de l'Europe
	<i>H. caucasica</i> , <i>H. aterrima</i> , <i>H. nigricornis</i>	Régions montagneuses
Genre <i>Atylotus</i>	<i>A. fulvus</i> , <i>A. rusticus</i>	Europe
Genre <i>Tabanus</i>	<i>T. bromius</i> , <i>T. sudeticus</i> , <i>T. autumnalis</i> , <i>T. maculicornis</i> , <i>T. cordiger</i> , <i>T. bovinus</i> , <i>T. glaucopis</i> , <i>T. miki</i> <i>T. quatuornotatus</i> , <i>T. rupium</i> , <i>T. bifarius</i> , <i>T. tenuicornis</i> , <i>T. unifasciatus</i> , <i>T. tergestinus</i> , <i>T. paradoxus</i> , <i>T. spodopterus</i> <i>T. nemoralis</i> , <i>T. lunatus</i> , <i>T. exclusus</i> , <i>T. regularis</i> , <i>T. spectabilis</i> , <i>T. eggeri</i>	Europe Sud de l'Europe
Genre <i>Glaucops</i>	<i>G. hirsutus</i> [†]	Région méditerranéenne Centre et ouest de l'Europe
Tribu Haematopini		
Genre <i>Haematopota</i>	<i>H. pluvialis</i>	Europe
Genre <i>Heptatoma</i>	<i>H. pellucens</i> [‡]	Centre et nord de l'Europe
Tribu Diachlorini		
Genre <i>Philipomyia</i>	<i>P. aprica</i>	Europe
Genre <i>Dasyrhamphis</i>	<i>D. ater</i>	Sud de l'Europe

[†] Seule espèce du genre en Europe[‡] Genre monotypique

Encart 1 : Diversité morphologique des Tabanidae (Chvála *et al.* 1972)

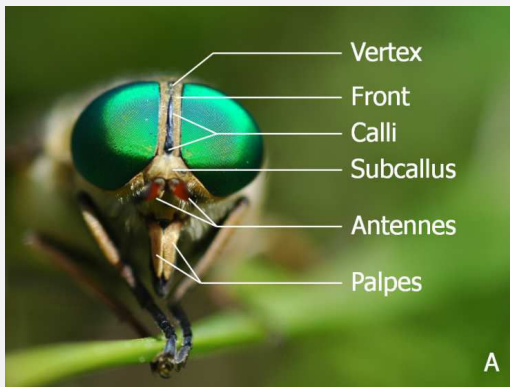


Figure A. Tête de *P. aprica*, vue de face (F. Baldacchino, 2012)

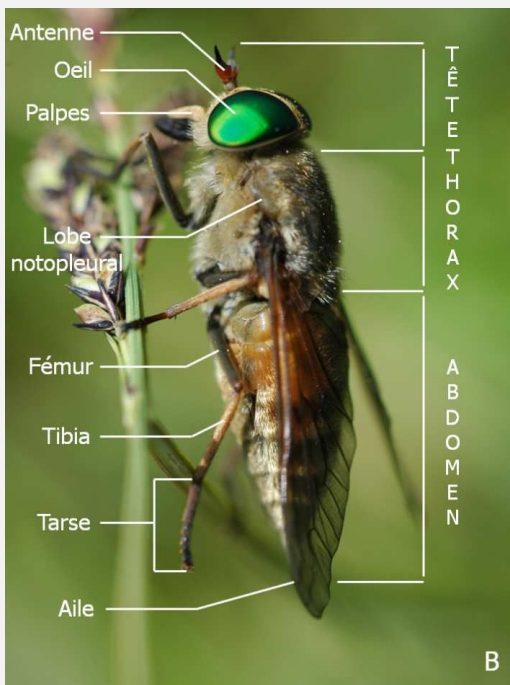


Figure B. Corps de *P. aprica*, vue de profil (F. Baldacchino, 2012)

Thorax et abdomen

Le thorax est une structure relativement stable chez les Tabanidae. Il est robuste, avec des lobes notopleuraux proéminents et des muscles alaires développés. La nervation alaire est remarquablement constante chez les Tabanidae. En revanche, la forme et les motifs des ailes sont plus variés. La majorité des espèces ont des ailes claires voire fumées (e.g. *Pangonius* et *Dasyrhamphis*). Les *Chrysops* présentent des bandes sombres sur les ailes, utiles à l'identification des espèces. Les ailes des *Haematopota* sont mouchetées avec une teinte grise ou marron. Les pattes varient peu au sein de la famille. Seuls les tibias postérieurs présentent des épines apicales chez les Pangoniinae et les Chrysopsinae. L'abdomen des Tabanidae est habituellement aussi large que le thorax, légèrement aplati et avec des motifs colorés plus ou moins distincts utiles à l'identification.

Tête

La tête est plus ou moins hémisphérique, largement occupée par des yeux à facettes. Ces yeux présentent souvent des motifs colorés qui aident à l'identification. Chez les mâles, les yeux sont holoptiques tandis que chez les femelles, ils sont séparés par une zone frontale. Des soies recouvrent la surface du front à l'exception de certaines zones, les calli, dont les motifs ont une grande importance taxonomique. On distingue le callus basal du callus médian. Les calli sont réduits voire absents chez *Atylotus* et ils sont absents chez *Pangonius*. Les Pangoniinae et les Chrysopsinae possèdent trois ocelles distincts au niveau du vertex qui sont absents chez les autres espèces. Chez *Hybomitra*, un tubercule ocellaire vestigial est tout de même présent.

Les antennes sont d'une importance majeure dans la classification, à plusieurs niveaux. Le flagellum (3^{ème} article) est divisé en plusieurs segments, le segment basal étant plutôt élargi avec une dent dorsale chez les Tabanini et plutôt allongé chez les Chrysopsini et les Haematopini.

Les femelles (à l'exception des *Pangonius*) ont un proboscis large avec une paire de mandibules et de maxillaires qui cisailent la peau lors du repas de sang. Les femelles *Pangonius* ont un proboscis long plus adapté à l'extraction du nectar. Les mâles ne possèdent pas de mandibules. Les palpes des femelles sont plus ou moins allongés et souvent courbés alors que les palpes des mâles sont plutôt courts et arrondis. Ils ont aussi un rôle taxonomique.

1.1. Cycle de développement

1.1.1. Œufs

Les femelles Tabanidae pondent entre 100 et 800 œufs (1-3 mm) en masse, leur nombre dépendant de l'espèce et de la taille du repas de sang (Figure 2). Les œufs sont blancs au moment de l'oviposition puis ils s'assombrissent (gris, marron ou noirs). Les pontes sont trouvées souvent sur les tiges et les feuilles de la végétation en bordure d'étangs ou de ruisseaux, ou sur les arbres surplombant l'eau. Certaines espèces plutôt associées à des ruisseaux à faible débit pondent sur des cailloux au-dessus de la ligne d'eau. D'autres espèces sont davantage terrestres et pondent sur la végétation ou la litière. L'embryogénèse dure 5 à 12 jours à 21-24°C et dépend de l'espèce et de la température (Mullen & Durden 2002).

1.1.2. Larves et pupes

Il existe un large spectre de milieux favorables au développement larvaire chez les Tabanidae compte-tenu de la diversité des espèces et de leur capacité d'adaptation. Les habitats larvaires rencontrés sont ainsi très variés, qu'ils soient aquatiques, semi-aquatiques ou terrestres. Les larves de taons peuvent se développer dans la vase ou la végétation dense des marais, des étangs ou en bordure de ruisseaux, sous les rochers des ruisseaux ou sous la litière d'une forêt (Mullen & Durden 2002).

Andreeva (1982) distingue, chez les larves de Tabanidae, trois types morpho-écologiques : rhéophiles (et subrhéophiles), hydrobiontes (et hémi-hydrobiontes) et édaphobiontes. Ces trois types morpho-écologiques se caractérisent par des milieux de vie différents (milieu aquatique avec courant, eaux stagnantes et sol humide) et des critères morphologiques différents (forme du corps, appendices locomoteurs, tubercule anal). Si les limites entre ces différents morphotypes sont clairement définies, il existe de nombreuses formes intermédiaires qui résultent de l'adaptation de certains types à des habitats différents.

Les larves de Tabanidae sont généralement prédatrices et se nourrissent d'invertébrés comme des larves de chironomes ou de tipules, ou des annélides. Elles peuvent aussi être cannibales. Les taons effectuent plusieurs mues larvaires successives (6-13) et en milieu tempéré, supportent l'hiver à l'état larvaire (diapause). Ainsi, la plupart des espèces tempérées sont univoltines alors que les espèces exotiques font plutôt deux générations par an, voire plus. En revanche, les espèces tempérées de grande taille restent à l'état larvaire pendant 2 ou 3 ans. Le développement larvaire dure plus longtemps en cas de conditions très défavorables (températures très froides, sécheresse). Au printemps, les larves quittent leur milieu humide pour aller à la surface du sol et se transforment en pupes. La pupaison varie en fonction des espèces et de la température. Elle dure entre 4 et 21 jours (Mullen & Durden 2002).

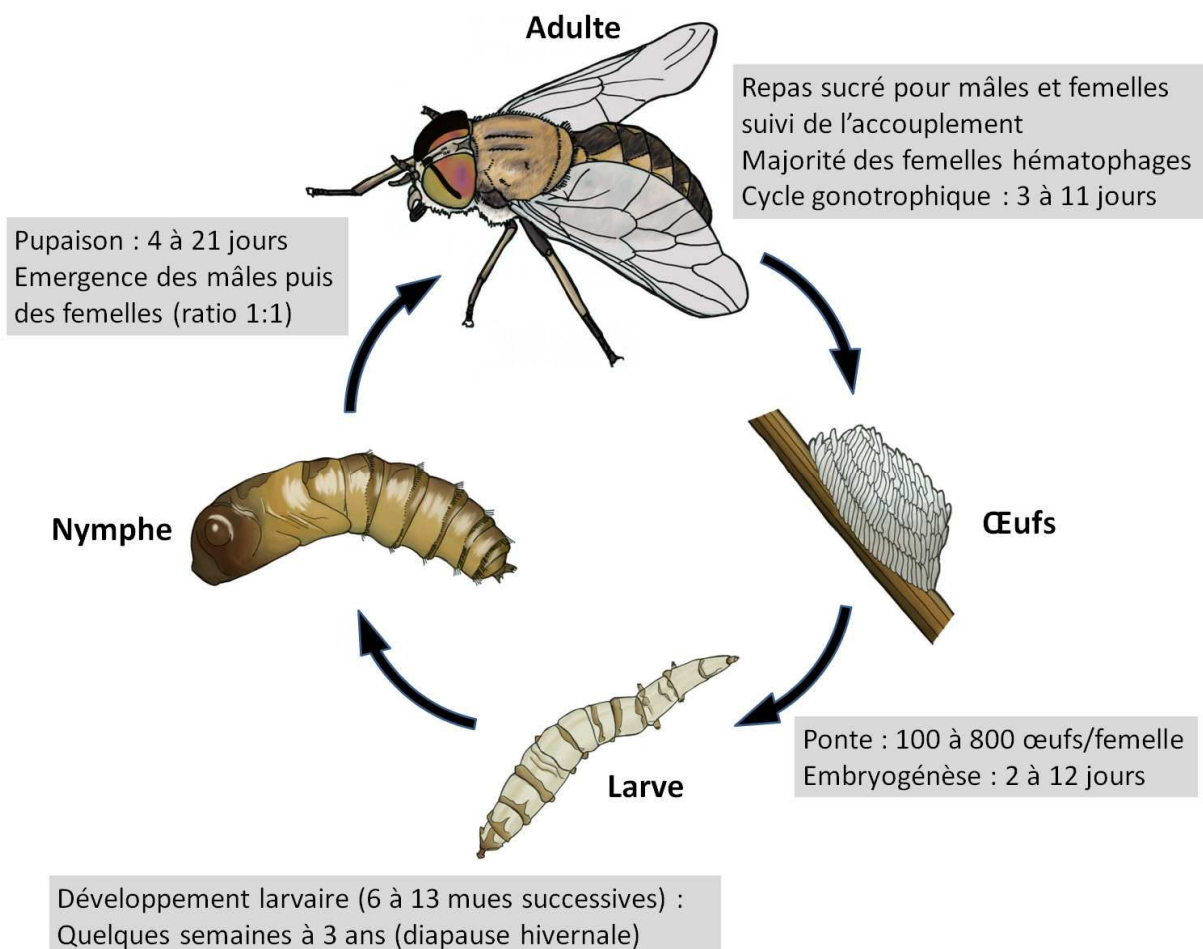


Figure 2. Illustration du cycle de vie des Tabanidae(F. Baldacchino & G. Bosco, 2013)

Encart 2 : Élevage de taons, difficultés et bonnes pratiques

Aucune population de Tabanidae de laboratoire n'est disponible à ce jour. Les élevages de taons, qui ont été mis en place, ont consisté à assurer l'alimentation (repas sucré et repas de sang) de femelles sauvages déjà accouplées, à permettre le développement d'œufs récupérés sur le terrain et à favoriser la survie des larves jusqu'à pupaison et émergence des adultes (Marchand 1917; Cameron 1932; Roberts 1966; Sofield & Hansens 1984).

Les principaux obstacles rencontrés en conditions de laboratoire sont (Thompson & Krauter 1978; Amano 1991) :

- La réticence des femelles adultes à prendre un repas sanguin
- L'effet inhibiteur des cages sur la reproduction des adultes
- L'oviposition plutôt aléatoire à l'intérieur des cages
- Les conditions peu propices à la maturation des œufs
- L'alimentation des larves à partir de proies vivantes
- Le cannibalisme des larves
- La longue période de développement des larves due à la diapause
- La mortalité lors de la pupaison liée à des troubles physiologiques
- La contamination par des pathogènes variés

De multiples tentatives d'élevage ont été menées sur des espèces différentes et les résultats obtenus ne sont pas toujours extrapolables d'une espèce à l'autre. Certaines bonnes pratiques peuvent toutefois être mises en œuvre pour optimiser les élevages de taons :

- L'apport de sucre est indispensable à la survie des femelles adultes. *Tabanus lineola* et *T. fuscicostatus* survivent 4 à 5 jours maximum en l'absence de repas sucré même avec un apport en sang (Wilson 1967).
- Le gorgement des femelles sur membrane dépend de la chaleur et des stimuli chimiques qui peuvent être perçus. L'usage de serviettes Kimwipes® comme membrane permet d'obtenir un meilleur taux de gorgement (83%) que le Parafilm® (19%) chez *T. nigrovittatus* (Downer *et al.* 2007).
- La mortalité larvaire est généralement très élevée à cause de la contamination du milieu de développement. Sofield et Hansens (1984) ont fait passer le taux de mortalité de 95% à 70% en manipulant soigneusement les larves et en leur donnant moins de nourriture (asticots) tout en changeant l'eau. Un système de circulation d'eau en continue permet également d'avoir un taux de mortalité relativement faible chez *T. nipponicus* (65%) (Amano 1991).
- La température et la photopériode influencent la diapause et la pupaison des larves. Des larves de *T. nigrovittatus* maintenues à 27°C avec une photopériode de 16h « jour » et 8h « nuit » ne sont pas entrées en diapause. Elles se sont transformées en nymphes après 78 à 155 jours (Sofield & Hansens 1984).

1.1.3. Adultes

La biologie des adultes est mieux connue que celle des larves. Le sexe ratio à l'émergence est environ de 1:1, les mâles émergeant 1 ou plusieurs jours avant les femelles (Mullen & Durden 2002). Mâles et femelles ont besoin d'un repas sucré à partir du nectar et du pollen des fleurs pour avoir l'énergie nécessaire à leur métabolisme de base, au vol et à l'accouplement. L'accouplement se fait en vol, plutôt le matin, de façon isolée ou par petits groupes de mâles. L'agrégation de mâles a été observée au sommet des collines (Leprince *et al.* 1983).

Les femelles Tabanidae sont généralement anautogènes et ont besoin d'un repas de sang pour la production d'œufs. Mais certaines espèces, comme *T. nigrovittatus*, sont autogènes, c'est-à-dire qu'elles n'ont pas besoin de sang pour effectuer leur premier cycle gonotrophique (Wall & Doane Jr 1980). Les femelles de la plupart des espèces européennes sont hématophages à l'exception de quelques espèces (*A. sublunaticornis*, *A. plebejus*, *G. hirsutus* et probablement toutes les femelles *Pangonius* sp.) (Chvála *et al.* 1972).

Elles s'accouplent le plus souvent avant de chercher un hôte vertébré. La majorité des espèces, en particulier les Tabaninae, piquent des grands mammifères (vache, cheval ou cerf). Mais certaines espèces comme les *Chrysops* ou les *Haematopota* ont une plus grande variété d'hôtes : homme, oiseaux, reptiles. En conditions de laboratoire, l'oviposition de femelles *Tabanus* spp. a lieu entre 7 et 11 jours après le repas sanguin (Magnarelli 1985; Tucker & Lancaster 1990).

Les études sur les taons s'intéressent le plus souvent aux adultes qui sont plus faciles à collecter sur le terrain que les larves. En effet, la grande variabilité des gîtes larvaires et leur dispersion dans l'environnement complique beaucoup les campagnes de prospection. De plus, ces études portent uniquement sur les populations sauvages. En effet, l'élevage des taons en conditions de laboratoire est très difficile compte-tenu des nombreuses contraintes liées à leur cycle de développement (Encart 2). A ce jour, aucun accouplement n'a été observé en conditions contrôlées et il n'existe aucune lignée expérimentale de taons.

1.2. Écologie des adultes

1.2.1. Période d'activité

1.2.1.1. *Activité saisonnière*

Le stade adulte est relativement court comparé au stade larvaire puisqu'il dure environ 6 semaines (Chvála 1979). En Europe, les taons sont actifs de la mi-juin à la fin août. Dans les régions nordiques ou montagneuses, les températures printanières plus basses retardent la pupaison et la période d'activité des adultes est plus courte (fin juin à fin juillet). A contrario, dans le sud de l'Europe, les taons émergent plus tôt (mars-avril).

Les espèces tempérées se succèdent au fil de la saison. Les *Hybomitra* sont souvent les premières espèces à émerger dès la fin mai (Dusbabek 1986; Kiliç 1993; Altunsoy & Kiliç 2012). D'autres espèces comme *T. bromius* ou *P. aprica* sont plus abondantes en juillet.

Les pics d'abondance des différentes espèces varient normalement peu d'une année à l'autre. Toutefois, des changements météorologiques saisonniers importants peuvent modifier le moment d'émergence des adultes, la durée de la période d'activité et le pic d'abondance (Krčmar 2005b). Ainsi, Hackenberger *et al.* (2009) ont observé une activité précoce de *T. bromius* en 2007 dans les montagnes de Velika Kapela probablement due à des températures supérieures de 3°C par rapport aux moyennes de saison.

1.2.1.2. *Activité journalière*

Les mâles sont actifs pour la reproduction au crépuscule (matin et soir). Ils volent souvent en petit groupe de façon stationnaire en attendant les femelles.

Les femelles taons se nourrissent sur des hôtes vertébrés la journée, à l'exception de *T. paradoxus* considérée comme la seule espèce nocturne en Europe (Chvála *et al.* 1972). Elles possèdent le plus souvent un seul pic d'activité dans la journée, souvent vers midi, mais certaines espèces peuvent être plus actives en début ou en fin d'après-midi, voire en début de soirée (Chvála 1979; McElligott & Galloway 1991; Oliveira *et al.* 2007). Une activité bimodale a été observée chez des espèces exotiques comme *Haematopota* spp. en Ouganda (Harley 1965) et *Cryptotylus unicolor* en Guyane (Raymond 1987). L'activité de vol des taons est particulièrement

influencée par les conditions climatiques (vent, humidité, température...) et chaque espèce de taons peut répondre différemment aux fluctuations météorologiques (Van Hennekeler *et al.* 2011).

L'abondance et l'activité des différentes espèces de taons peuvent donc varier considérablement en fonction des paramètres environnementaux. Les milieux de montagne, caractérisés par une grande hétérogénéité des conditions de vie, sont propices à la coexistence de nombreuses espèces. Jusqu'à ce jour, les études sur l'écologie des Tabanidae dans les prairies et les pelouses d'altitude ont été très limitées. Seul Leclercq (1977) a caractérisé la distribution des espèces le long d'un gradient altitudinal dans les Pyrénées et les Alpes. Or, si l'altitude a une influence sur le climat, l'exposition, la structure et la dynamique du paysage ont également une influence sensible sur les conditions de vie et la disponibilité d'habitats pour les différents stades de développement. Les troupeaux en estive évoluant souvent dans des matrices paysagères complexes, il est ainsi nécessaire de mieux caractériser l'activité des taons dans ce type de milieu pastoral, d'estimer la nuisance pour le bétail et d'évaluer l'influence propre des différents paramètres environnementaux sur la diversité des espèces de taons, sur leur abondance et sur le comportement de piquêre des femelles.

1.2.2. Recherche d'hôtes par les femelles

1.2.2.1. Caractéristiques de vol et capacité de dispersion

La localisation d'un hôte est souvent cruciale pour les insectes hématophages pour assurer leurs besoins nutritionnels et reproducteurs. Les diptères, en particulier, doivent repérer à distance un hôte vertébré mobile (Gibson & Torr 1999). Pour cela, ils vont utiliser des signaux visuels et olfactifs. Les taons adopteraient deux types de stratégies dans la recherche d'hôtes : soit l'attente à l'affût (« sit and wait »), soit la recherche active (« ranging») qui serait privilégiée.

Les femelles taons ont des trajectoires de vol non linéaires afin d'augmenter leur probabilité de trouver un hôte (x2,5 par rapport à une trajectoire rectiligne) (Konstantinov 1993). Les diptères zigzaguent en remontant et en traversant les courants d'airs (anémotaxie) à la recherche d'une

odeur (Kennedy 1983) qui va influencer la vitesse (orthokinésie) et la sinuosité (klinokinésie) de leur vol. Le vol de certaines mouches hématophages (*G. morsitans morsitans* et *S. calcitrans*) a été étudié en tunnel de vol. Ces mouches volent moins vite et de façon plus sinueuse en réponse à un large flux de CO₂ (Schofield *et al.* 1995; Paynter & Brady 1996).

En mode de recherche active, les femelles taons utilisent leur vol puissant pour prospecter sur plusieurs kilomètres. Leur dispersion est alors liée à la disponibilité en hôtes (Mullen & Durden 2002). Des taons marqués ont ainsi pu être recapturés à plus de 6 km du site de lâcher (Sheppard & Wilson 1976). L'étude de la capacité de dispersion des femelles *T. abactor* montre des taux de recapture relativement élevés (9% pour les femelles gorgées et 4% pour les non-gorgées) et 85% des femelles ont été recapturées dans les 8 jours (Cooksey & Wright 1987). Ces études suggèrent que les taons se dispersent par une série de vols courts et qu'ils peuvent rester ou revenir sur le site de leur précédent repas de sang. Konstantinov (1993) estime le vol quotidien moyen d'un *Hybomitra* sp. à environ 1 km, avec un maximum de 2 km.

1.2.2.2. Fonctions sensorielles mises en jeu

La recherche d'hôtes vertébrés fait intervenir essentiellement la vision et l'olfaction des femelles. Pour évaluer l'importance respective des signaux visuels et olfactifs, Vale & Phelps (1974) ont comparé l'attractivité d'une cible visuelle (modèle animal) seule, d'une odeur de bœuf seule et de l'association des deux. Les taons étaient attirés par les stimuli visuels et olfactifs séparément, mais les collectes étaient plus élevées lorsque les 2 stimuli étaient utilisés conjointement. Vale & Phelps (1974) suggèrent que les signaux olfactifs induisent un comportement de recherche à distance alors que les signaux visuels aident davantage à l'approche finale. Pour évaluer la distance à partir de laquelle les taons étaient attirés par l'odeur de bœuf, Phelps & Vale (1976) ont ensuite placé des écrans électriques dans le sens du vent (4-120 m) et contre le vent (15-30 m) par rapport à un bœuf. L'attraction de femelles *P. zonata* démarre à 80 m sous le vent et à 15 m contre le vent alors que l'attraction de femelles *Tabanus* sp. ne démarre qu'à 15 m sous le vent.

1.2.2.2.1. La vision

Les études sur la vision des taons ont d'abord montré l'influence des formes et des couleurs d'une cible. Phelps & Vale (1976) ont montré qu'un stimulus visuel vertical était moins attractif qu'un stimulus visuel horizontal. Brown & Bennett (1980) ont collecté davantage de taons sur des pièges collants bleus, noirs ou rouges comparés à des pièges jaunes. De plus, la présence de tissus noir à l'intérieur d'un piège augmente la collecte de taons comme cela a été montré chez les glossines (Green & Flint 1986; Phelps & Holloway 1992). Mihok (2002) a ainsi mis au point un piège simple et polyvalent, le piège Nzi, fabriqué à partir de tissus bleu et noir qui s'est révélé être très efficace pour les Taons en Afrique, en Amérique du Nord et en Australie (Mihok *et al.* 2006; Van Hennekeler *et al.* 2008). Les taons sont également très sensibles aux mouvements. Un bœuf mobile attire davantage de taon qu'un bœuf immobile (Phelps & Vale 1976). Enfin, les taons ont des sites de piqûres très spécifiques ce qui laisse penser que les signaux visuels à la surface du corps jouent un rôle dans l'approche finale (Mullens & Gerhardt 1979; Phelps & Holloway 1990; Blahó *et al.* 2012a).

Récemment, Horváth *et al.* (2008) ont montré que les mâles et les femelles réagissent positivement à la lumière polarisée. Cette vision polarisée ventrale, habituellement propre aux insectes aquatiques, pourrait être utile dans certaines circonstances de la vie des taons (Horváth *et al.* 2008):

- La recherche d'hôtes herbivores qui s'abreuvent régulièrement aux points d'eau ;
- Le repérage des gîtes larvaires favorables et l'oviposition ;
- L'abreuvement et le contrôle de la température ;
- L'orientation des mâles vers les femelles avant accouplement.

Les femelles sont également sensibles à la polarisation de la lumière réfléchi par le pelage d'un animal. Ainsi, un animal sombre attire davantage qu'un animal clair, et un animal avec de nombreuses petites taches est moins attractif qu'un animal à la robe uniforme (Horváth *et al.* 2010; Blahó *et al.* 2012a). La découverte de cette vision polarisée chez les taons a permis la mise au point de nouveaux types de pièges (Blahó *et al.* 2012b; Egri *et al.* 2013a).

1.2.2.2.2. L'olfaction

Les recherches sur les attractifs des taons ont été menées en Afrique, parallèlement aux études sur les glossines, mais aussi en Amérique du Nord et en Europe (Amsler & Filledier 1994; Krčmar *et al.* 2006; Mihok *et al.* 2006). Le dioxyde de carbone (CO₂) est le premier attractif qui a été identifié chez les taons (Wilson *et al.* 1966; DeFoliart & Morris 1967). Puis, Vale & Phelps (1974) ont constaté que l'odeur d'un bœuf était également attractive. Vale (1980) a alors comparé l'attractivité du CO₂ à l'odeur émise par un bœuf. Les collectes de *P. zonata* étaient équivalentes avec le CO₂ à un débit de 3 L/min (x30 par rapport au témoin) et avec l'odeur de bœuf (x35). Lorsque le débit du CO₂ passait à 15 L/min, le CO₂ (x56) était beaucoup plus attractif que l'odeur de bœuf (x6). Selon Vale (1980), l'attractivité de l'odeur de bœuf serait à peu près entièrement due au CO₂.

Par la suite, plusieurs études ont démontré l'attractivité du CO₂ chez différentes espèces de taons (Kline *et al.* 1991; Hayes *et al.* 1993; Leprince *et al.* 1994; Cilek & Olson 2008). Le CO₂ pourrait ainsi être un stimulus important dans la recherche et la détection d'hôtes par les femelles (Leprince & Jolicoeur 1986). McElligott & McIver (1987) ont suggéré que le CO₂ agissait à courte et moyenne distance de l'hôte car les collectes d'*Hybomitra* spp. étaient quasi-nulles lorsque les pièges étaient installés à une distance supérieure à 7 m de la source de CO₂ (1 L/min). Toutefois, en comparant l'attractivité d'un bœuf et celle de pièges Canopy avec du CO₂, Leprince *et al.* (1994) ont observé des résultats différents selon les espèces. *Tabanus fuscicostatus* et *T. lineola* étaient capturés en plus grand nombre dans les pièges avec CO₂ (par rapport au bœuf) alors que c'était l'inverse pour *L. annulatus*.

En plus du CO₂, l'octenol et les phénols ont été identifiés comme des composés attractifs pour les taons, de même que les urines d'ongulés (Phelps & Holloway 1992; Djiteye *et al.* 1998; Krčmar *et al.* 2005; Krčmar *et al.* 2006; Krčmar 2007; Mihok *et al.* 2007; Van Hennekeler *et al.* 2008; Mihok & Mulye 2010; Mihok & Lange 2012). Mais, là encore, les réponses des différentes espèces de taons à ces attractifs peuvent varier. En Croatie, par exemple, les pièges Canopy avec de l'urine d'âne vieillie ont collecté significativement plus d'*A. loewianus* que les pièges avec un mélange octenol-acétone-ammoniaque (5:3:2) alors qu'il n'y avait pas de différences entre ces deux appâts pour *Tabanus* spp. (Krčmar *et al.* 2010).

Il existerait ainsi des différences de sensibilité olfactive entre les espèces de taons. Selon Mihok & Mulye (2010), ces différences pourraient expliquer en partie les résultats contrastés qui ont été observés avec les phénols en Afrique, en Croatie et en Amérique du Nord. Mais les études sur l'olfaction des Tabanidae ont été basées essentiellement sur les réponses comportementales mises en évidence sur le terrain par les différences de captures entre pièges témoin et pièges avec attractif odorant. Or l'interaction entre les stimuli visuels et odorants qui caractérise souvent ces dispositifs ne permet pas d'évaluer précisément la sensibilité olfactive des insectes. Celle-ci ne peut être mise en évidence que par l'étude physiologique des organes olfactifs, à savoir les antennes. De telles études n'ont encore jamais été réalisées.

1.3. Importance médicale et vétérinaire

1.3.1. Nuisance

Les taons ont un impact sur la santé humaine et animale, d'une part à cause de la nuisance qu'ils occasionnent, d'autre part à travers la transmission d'agents pathogènes (Mullen & Durden 2002). La nuisance des taons est liée à leur piqûre, à leur comportement autour de l'hôte et à la perte de sang induite par la piqûre. Les taons sont des diptères telmophages, par opposition aux diptères solénophages comme les moustiques (Lehane 2005). Une fois posée, la femelle commence par cisailer la peau de l'hôte avec ses mandibules puis elle suce le sang qui s'écoule de la plaie. Sa piqûre est donc très douloureuse. De plus, la femelle harcèle véritablement son hôte afin de trouver un site de piqûre favorable où elle pourra se gorger complètement sans être chassé. En cas d'interruption, elle va immédiatement chercher à compléter son repas sanguin en attaquant le plus souvent le même individu (Desquesnes *et al.* 2009). Une femelle taon ponctionne de 20 µL pour les espèces de petite taille (e.g. *C. callidus*) à plus de 600 µL pour les espèces de grande taille (e.g. *T. atratus*) (Hollander & Wright 1980).

Chez l'Homme, les taons sont surtout gênants pour les agriculteurs (élevage, riziculture) et les personnes pratiquant des activités de loisirs en extérieur (camping, randonnées, golf, plaisance). Ils peuvent ainsi constituer un réel problème économique dans certaines zones comme par exemple à proximité des marais salants sur la côte Est des Etats-Unis où pullulent majoritairement deux espèces, *T. nigrovittatus* et *C. atlanticus* (Hansens 1979).



Figure 3. *P. aprica* sur une patte de vache. Les mouches sucent le sang autour de la piqûre de la femelle taon. (F. Baldacchino, 2012)

Mais les taons sont surtout une nuisance pour le bétail et les chevaux. Des attaques importantes peuvent entraîner une réduction du gain de poids des animaux, une baisse de la production de lait et des lésions au niveau des sites de piqûres. Une pression de 66 à 90 taons par jour peut réduire le gain de poids journalier de 0,1 kg chez des génisses, notamment à cause du stress induit par les attaques (Foil & Hogsette 1994). En Oklahoma (USA), pendant les périodes où les taons sont les plus actifs, Hollander & Wright (1980) ont estimé une perte de sang supérieure à 200 mL par animal et par jour. Les sites de piqûres vont de plus attirer les mouches suceuses ainsi que les mouches à l'origine de myiases (Foil & Hogsette 1994) (Figure 3).

1.3.2. Agents pathogènes transmis

Krinsky (1976) a répertorié l'ensemble des agents pathogènes pouvant être transmis par les taons. La plupart de ces pathogènes (virus, bactéries, protozoaires) sont transmis de façon mécanique mais pour certains, en particulier les filaires, les taons sont des vecteurs biologiques. Le tableau de l'annexe 2 synthétise l'ensemble des connaissances actuelles sur les associations observées entre certaines espèces de taons et certains agents pathogènes en mettant à jour la revue de Krinsky (1976). La transmission mécanique a été démontrée pour des virus (virus de l'anémie infectieuse des équidés), des bactéries (*Anaplasma marginale*, *Francisella tularensis*, *Bacillus anthracis*, ...) et des protozoaires (*Besnoitia besnoiti*, *Trypanosoma* spp.). Parmi les Trypanosomes, *Trypanosoma theileri* a la capacité de se développer dans l'intestin des tabanides et la contamination d'un hôte pourrait se faire principalement par ingestion des fèces de taons (Bose *et al.* 1987; Foil 1989). DeGiusti *et al.* (1973) ont également démontré qu'un tabanide (*C. callidus*) pouvait être un hôte intermédiaire pour un hémoprotozoaire (*Haemoproteus metchnikovi*). Enfin, les taons sont des vecteurs biologiques pour des nématodes filaires, en particulier *Loa loa*, agent de la loase qui sévit chez l'Homme en Afrique Centrale.

1.3.3. Clés de la transmission mécanique

La transmission mécanique d'un agent pathogène se déroule en 3 étapes (Foil 1989; Desquesnes *et al.* 2009) :

- Le vecteur commence son repas de sang sur un hôte infecté et contamine ses pièces buccales avec un agent pathogène.
- Le repas de sang est interrompu. Le vecteur retourne alors sur le même hôte ou cherche un nouvel hôte.
- Le vecteur trouve un nouvel hôte, non-infecté et susceptible, complète son repas de sang et introduit l'agent pathogène par le site de ponction.

Quelles sont les caractéristiques d'un bon vecteur mécanique ?

- Il est fréquemment interrompu lors du repas de sang.
- Il est très mobile.
- Il a des pièces buccales larges favorisant le transfert d'agents pathogènes.

Les taons sont donc d'excellents vecteurs mécaniques.

La transmission mécanique d'un agent pathogène va ainsi être influencée à la fois par le comportement des taons et celui de leurs hôtes.

Côté vecteur, le transfert d'un agent pathogène entre deux hôtes se fait mieux avec des grandes espèces de taons. En effet, les taons de grande taille changent d'hôtes plus fréquemment que ceux de petite taille et ils transportent davantage de sang résiduel sur leurs pièces buccales. Cependant, la densité des différentes espèces de taons au sein d'une population peut moduler l'importance relative des espèces les plus grandes. De plus, certaines espèces de taons sont plus agressives que d'autres. Elles vont alors harceler un seul individu jusqu'à gorgement (« feeding persistence »). Le comportement de ces espèces est moins favorable à la transmission mécanique (Foil 1989).

Côté hôtes, une densité élevée d'individus tend à diminuer le nombre de piqûres par individu (Duncan & Vigne 1979). Mais la proximité entre hôtes infectés et non infectés favorise le transfert d'agent pathogène. La distance entre les individus influence nettement le mouvement des taons entre les hôtes. Après l'interruption d'un repas sanguin, le pourcentage de taons qui change d'hôte passe de 11% pour une distance de 5 m à 0% pour une distance de 50 m (Barros & Foil 2007). Au sein d'une population d'hôtes, la prévalence et l'immunité sont également des variables qui vont influencer sur la transmission mécanique d'un agent pathogène.

La quantité et l'infectivité d'un agent pathogène transporté par un taon sur ses pièces buccales dépend de plusieurs facteurs notamment la quantité de sang résiduel qui reste sur les pièces buccales après un repas de sang interrompu, la quantité d'agent pathogène contenu dans le sang de l'hôte infecté et la résistance de l'agent pathogène dans l'environnement. La quantité de sang qui reste sur les pièces buccales d'un taon de taille moyenne comme *T. fuscicostatus* est de 10 ± 5 nL (Foil *et al.* 1987). En cas de titre élevé en agent pathogène chez l'hôte (par exemple, 10^6 doses infectieuses par millilitre pour le virus de l'anémie infectieuse équine), la piqûre d'un seul taon peut suffire à infecter un hôte susceptible (Hawkins *et al.* 1976). Enfin, des germes résistants

peuvent être transférés dans un délai plus long. C'est le cas de l'agent de la tularémie ou du bacille du charbon souvent associés à des infections chez l'Homme faisant suite à des piqûres de taons (Foil 1989).

Desquesnes *et al.* (2009) ont développé un modèle basé sur des expériences de transmission mécanique de *Trypanosoma vivax* par *A. agrestis*. Ce modèle généralisable à l'ensemble des agents pathogènes transmissibles par des vecteurs mécaniques (taons, stomoxes) est fonction, entre autres, de la parasitémie des hôtes, du nombre d'insectes par animal et de la prévalence initiale de l'infection. Pour qu'un parasite circule de façon mécanique au sein d'une population d'hôtes, il faut de plus que la présence d'hôtes infectés avec des parasitémies élevées coïncide avec de fortes densités de vecteurs. Pour cette raison, la transmission mécanique reste un phénomène avec une fréquence et un impact très variables (Desquesnes *et al.* 2009).

Les taons ne sont donc pas seulement des insectes nuisibles pour le bétail. Les épizooties récentes d'anémie infectieuse équine, de besnoitiose bovine ou encore de surra en Europe ont mis en évidence leur rôle de vecteurs mécaniques. Pour mieux comprendre l'implication des espèces tempérées dans la diffusion de ces maladies, il est nécessaire de mieux connaître leur comportement de piqûre. L'étude des espèces présentes dans les estives pyrénéennes est intéressante à ce titre car il s'agit d'une zone endémique de besnoitiose bovine.

1.4. Conclusion chapitre et objectifs de la thèse

L'étude de la biologie et de l'écologie des taons se heurte à des difficultés méthodologiques, en particulier l'absence de population de laboratoire, et doit faire face à la grande diversité des espèces et des modes de développement larvaire. Pour protéger les troupeaux domestiques, seules des mesures visant les insectes adultes, et spécifiquement les femelles, semblent envisageables à court ou moyen terme. Dans ces conditions, il paraît essentiel de comprendre le plus précisément possible les déterminants du contact entre les insectes et leurs hôtes. Comment les insectes se distribuent-ils dans les différents milieux pâturés, quels sont leurs hôtes préférentiels, comment les localisent-ils, quand et comment se nourrissent-ils sont autant de variables à prendre en

compte pour optimiser la protection des troupeaux. De telles recherches doivent en outre être conduites dans des zones de forte diversité (à la fois en Tabanidae et en hôtes potentiels).

Concernant l'écologie des taons, il apparaît ainsi que les estives de haute-montagne, qui ont jusqu'à présent été peu étudiées, sont au centre de nombreux enjeux : la diversité des habitats et les forts contrastes climatiques peuvent être favorables à la coexistence de nombreuses espèces de taons, la déprise pastorale du XXe siècle s'est accompagnée d'une forte augmentation des effectifs d'ongulés sauvages qui constituent autant d'hôtes potentiels pour les taons, enfin la richesse biologique remarquable et la grande vulnérabilité de ces milieux impliquent de réduire autant que possible l'usage des insecticides utilisés communément pour protéger les animaux.

Notre travail s'est donc organisé autour de deux grands axes :

- i) Le premier axe (chapitre 2) avait pour objectif de caractériser le comportement des femelles adultes dans leur environnement : identifier la réponse des différentes espèces aux facteurs environnementaux (préférences d'habitats), caractériser l'activité des taons au contact du bétail et les réactions de défense des animaux, estimer les éventuelles préférences trophiques des principales espèces ;
- ii) Le second axe (chapitre 3) était centré sur la physiologie olfactive et le comportement des femelles vis-à-vis des odeurs d'hôtes : nous avons à la fois cherché à déterminer si des espèces partageant un même habitat pouvaient avoir des tropismes olfactifs différents et si ces différences pouvaient être associées à des sensibilités antennaires spécifiques ; nous avons également évalué l'attractivité des kairomones que sont les urines d'ongulés et certains de leurs composés (octénol, phénols).

Chapitre 2 : Les Tabanidae et leurs hôtes dans les estives de haute-montagne

Toute étude d'écologie s'inscrivant dans un environnement déterminé étant susceptible de réduire la portée des résultats, il était essentiel de placer nos travaux dans un environnement contrasté potentiellement favorable à la coexistence de nombreuses espèces de taons et abritant une grande diversité d'hôtes potentiels.

En montagne, les vallées se caractérisent par des expositions à forte opposition (versants exposés Nord/Sud pour la chaîne pyrénéenne), par l'influence de différents climats et par un paysage en mosaïque (forêts, prairies, pelouses, végétations mixtes) issu des activités agro-pastorales (Esteban *et al.* 2009; Gracia *et al.* 2011). Dans ces espaces, les ongulés sauvages, notamment les cervidés, sont très nombreux et constituent des hôtes potentiels pour les taons, en plus des ongulés domestiques (Wilson & Richards 1969; Magnarelli & Anderson 1980). La diversité des paysages et la multiplicité des hôtes est ainsi favorable à la richesse et à l'abondance des taons (Leclercq 1977).

En France, les Pyrénées constituent une zone particulière puisqu'il s'agit d'une région endémique de besnoitiose bovine, maladie qui se propage en Europe depuis les années 2000 et dont les taons constituent des vecteurs mécaniques potentiels (Jacquiet *et al.* 2010; Alvarez-García *et al.* 2013).

Nos travaux sur l'écologie des Tabanidae dans les estives de haute-montagne ont donné lieu à trois publications :

- Un premier article (Article 1), publié dans *Bulletin of Entomological Research*, décrit la distribution spatio-temporelle des Tabanidae dans les estives et souligne l'influence de l'altitude et du paysage sur la richesse et l'abondance des espèces.
- Un deuxième article (Article 2), soumis à *Bulletin of Entomological Research*, caractérise l'activité des taons autour d'un troupeau et les réactions de défenses des bovins. L'utilisation de modèles linéaires généralisés mixtes nous a permis d'évaluer l'influence des conditions climatiques sur les attaques des taons.
- Un troisième article (Article 3), publié dans *Veterinary Parasitology*, illustre le comportement trophique des taons dans les Pyrénées et montre son implication potentielle dans la transmission de la besnoitiose bovine.

2.1. Influence des variables environnementales sur la distribution des Tabanidae

2.1.1. Différentes variables environnementales

2.1.1.1. Conditions météorologiques

Les conditions météorologiques varient en fonction du moment de l'année et de l'heure de la journée. Elles vont ainsi influencer la distribution saisonnière des espèces (Krčmar 2005b; Hackenberger *et al.* 2009) et leur activité journalière (Van Hennekeler *et al.* 2011). Les paramètres climatiques impliqués sont la température, l'humidité relative, l'évaporation, la vitesse du vent, la pression atmosphérique et l'intensité lumineuse ou le rayonnement solaire.

En Alabama (USA), Burnett & Hayes (1974) ont observé que la pression atmosphérique avait l'effet le plus important sur l'activité de femelles *Tabanus* spp. En Caroline du Nord (USA), Dale & Axtelle (1975) ont montré que l'activité optimale de *T. nigrovittatus* était corrélée à des températures proches de 25°C, à une intensité lumineuse intermédiaire (10 000 Lux) et à l'absence de vent. En Caroline du Sud, Alverson & Noblet (1977) ont trouvé que la pression atmosphérique, la température, l'humidité relative et la couverture nuageuse étaient des facteurs déterminants pour l'activité des taons. L'importance relative des différents paramètres climatiques semble être dépendante du type de piège utilisé pour évaluer l'activité des taons, du site d'étude et des espèces collectées.

Des études menées au Japon et en Australie ont confirmé que l'influence des conditions météorologiques variait d'une espèce à l'autre. À Kuriyagawa (Japon), Amano (1985) a montré que le rayonnement solaire, l'humidité relative et la vitesse du vent affectaient significativement l'activité de vol des femelles. Ainsi, une humidité relative élevée avait un effet négatif sur une espèce à activité diurne comme *T. nipponicus* et, au contraire, peu d'effet sur des espèces à activité crépusculaire.

À Townsville (Australie), Van Hennekeler *et al.* (2011) ont observé, de plus, que l'influence de certaines variables changeait en fonction de la période de la journée. Par exemple, sur la période 10h-13h, une augmentation de la vitesse du vent entraînait une diminution significative des collectes de *T. townsvilli*.

Des conditions climatiques très défavorables avec une température très basse, un rayonnement solaire très faible et une humidité relative très élevée ont ainsi un effet inhibiteur sur l'activité des femelles adultes. Le vent, lui, va directement affecter leur vol. En effet, lorsque la vitesse du vent excède la vitesse du vol de l'insecte, ce dernier n'a plus la capacité à diriger son vol. De plus, les rafales de vent perturbent les bouffées d'odeurs présentes dans l'air et l'insecte ne peut plus s'orienter correctement (Gibson & Torr 1999).

2.1.1.2. Altitude et exposition

En zone de montagne, l'altitude et l'exposition sont des facteurs déterminants pour les conditions météorologiques et le paysage. Deux types de variables environnementales changent avec l'altitude, celles physiquement liées à l'élévation par rapport au niveau de la mer (pression atmosphérique, température, luminosité...) et celles qui ne sont pas spécifiques à l'altitude (humidité, vent, durée d'ensoleillement, nature du sol...) (Körner 2007). Des expositions ou des versants opposés sont le plus souvent soumis à des types de climats différents.

Les études menées sur les Tabanidae dans des zones d'altitude sont peu nombreuses. Des collectes faites au Tennessee (USA) à deux altitudes différentes (250 et 600 m) ont montré que certaines espèces étaient présentes uniquement à 600 m alors que la plupart des espèces étaient présentes partout (Mullens & Gerhardt 1980). En Croatie, l'altitude et la végétation expliquaient en partie la richesse et l'abondance des espèces capturées le long d'un transect (6 – 1157 m) (Hackenberger *et al.* 2009). De plus, les déterminants climatiques étaient différents selon le versant considéré : température et vent pour le versant sud (climat méditerranéen) et humidité pour le versant nord (climat continental). En Arménie, Dolin & Andreeva (1983) ont observé que l'activité de *T. infestus* dépendait de l'altitude dans la région montagneuse du Nakhitchevan (1400-1700 m).

En France, la diversité des taons et leurs altitudes préférentielles ont été étudiées dans les Alpes et les Pyrénées par Leclercq (1971a, b). La limite entre espèces « de plaines » et espèces « de montagnes » se situe aux environs de 600 m en Suisse mais, ailleurs, cette estimation varie suivant la latitude et l'exposition du massif (Leclercq 1977).

2.1.1.3. Structure du paysage

Les communautés d'insectes sont influencées par les variations d'habitats soit à l'échelle du paysage soit à l'échelle de l'habitat. La réponse dépend de la taille du taxon considéré, de son domaine vital et de sa capacité de dispersion. Par exemple, dans les zones de montagnes, la richesse et l'abondance des différentes espèces de bourdons sont liées à la structure du paysage à l'échelle de l'habitat et du paysage (Hatfield & LeBuhn 2007).

Chez les Tabanidae, l'habitat forestier est un habitat préférentiel pour le repos (Okiwelu 1977). Au Texas (USA), une étude a montré que les femelles *T. abactor* privilégiaient, pour leur repos nocturne, les vallées ou versants abrités à basse altitude par rapport aux collines ouvertes (Kingston *et al.* 1986). Dans ces sites, les taons sont capturés à différentes hauteurs (42% entre 1 et 1,50 m au-dessus du sol) dans des habitats densément couverts.

Les milieux ouverts, par contre, sont plus favorables à la recherche active d'hôtes puisqu'un hôte est détectable plus facilement et de plus loin qu'en milieu forestier (Barros 2001). En Louisiane (USA), une activité maximale de *T. fuscicostatus* et *T. lineola* a été observée en lisière de forêt. L'activité de ces taons diminuait de façon significative en milieu ouvert, au-delà de 200 m, et en forêt, au-delà de 20 m (Sheppard & Wilson 1977). Il existe donc un effet lisière sur l'activité des femelles à petite échelle. Mais la structure paysagère forêts – zones ouvertes influence-t-elle également la richesse et l'abondance des espèces de taons à plus grande échelle?

2.1.2. Distribution spatio-temporelle des Tabanidae dans les Pyrénées

Article 1 : Spatial and temporal distribution of Tabanidae in the Pyrenees Mountains:
the influence of altitude and landscape structure.

F. Baldacchino, A. Porciani, C. Bernard & P. Jay-Robert.

Bulletin of Entomological Research, in press (2013)

<http://dx.doi.org/10.1017/S0007485313000254>

Résumé

Différents paramètres environnementaux semblent influencer la distribution des Tabanidae, notamment l'altitude et le paysage (Sheppard & Wilson 1977; Dolin & Andreeva 1983; Hackenberger *et al.* 2009). Cependant, la distribution des taons est très peu documentée dans les zones de montagnes, en particulier aux altitudes où le bétail passe l'été (> 1500m). Nous avons donc mis en place un dispositif expérimental afin (i) d'évaluer l'influence de l'exposition, de l'altitude, de la proximité des points d'eau et du paysage forestier sur la richesse et l'abondance des taons, et (ii) d'étudier l'activité saisonnière et journalière des principales espèces présentes.

Deux vallées ont été choisies comme sites d'étude (Figure 4), l'une exposée au nord et l'autre exposée au sud. Des pièges Nzi et Vavoua (Figure 5), appâtés avec de l'urine de vache vieilles, ont été installés en binôme dans chaque vallée le long d'un gradient altitudinal (~1500, ~1800 et ~2000 m) et à distance croissante de la rivière (0, 200 et 400 m) (Figure 6). La structure paysagère a été définie dans une zone tampon de 200 m (diamètre) autour de chaque position de piégeage ($N=18$). Les habitats forestiers (forêts denses) et ouverts (pelouses, pâtures, tourbières, végétation mixte, roches, eau) ont été délimités sous ArcMap 9.3 (ESRI Inc., California, USA) dans chaque zone tampon et caractérisés selon la surface totale (ha) – Class Area (CA) –, la surface moyenne (ha) – Mean Patch Size (MPS) – et la complexité de la forme (m/ha) – Mean Perimeter Area Ratio (MPAR).

Huit sessions de collecte de 48h ont été menées entre mai et octobre 2011 pour suivre l'activité saisonnière des taons. Pour étudier l'activité journalière des principales espèces, nous avons effectué trois sessions de collectes de 12h avec des relevés toutes les 2h, entre 7h et 19h. Les taons collectés ont été identifiés d'après les clés de Chvála *et al.* (1972).



Figure 4. Vallée de Mantet, Pyrénées-Orientales, France (L. Puech, 2012)



Figure 5. Pièges Nzi et Vavoua en binôme (P. Jay-Robert, 2011)

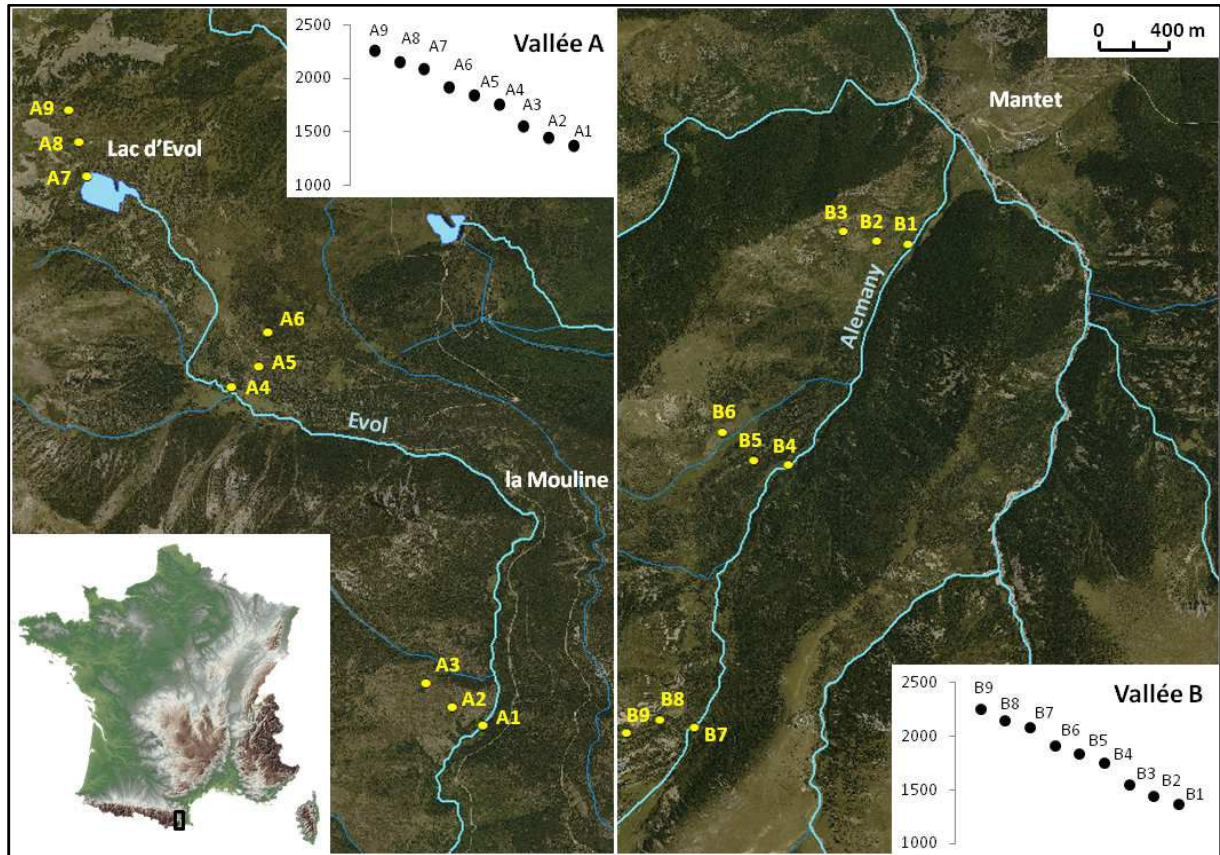


Figure 6. Sites d'étude : Vallées A (la Mouline) et B (Mantet)

Les localisations des pièges sont notées de 1 à 9 selon un gradient altitudinal.

2020 taons (dont un mâle) appartenant à 19 espèces ont été collectés (Genres *Philipomyia*, *Tabanus*, *Hybomitra*, *Atylotus*, *Haematopota* et *Chrysops*). Les pièges Nzi se sont révélés les plus efficaces pour la collectes des Tabanini (tests significatifs pour *Philipomyia* et *Tabanus*, espèces les plus abondantes). Ces pièges ont également montré leur efficacité en Afrique, en Amérique du Nord et en Australie (Mihok 2002; Mihok *et al.* 2006; Van Hennekeler *et al.* 2008).

Une première analyse en composantes principales (ACP) a montré qu'une des 18 positions de piégeage présentait une faune particulière. Il s'agissait d'une position située à proximité d'un lac d'altitude, particulièrement propices aux *Chrysops* et aux *Haematopota*. Cette position a été exclue pour la suite des analyses. Une analyse canonique des correspondances (ACC) a été réalisée avec les 17 positions restantes et les différentes variables environnementales (exposition,

altitude, distance à la rivière et paramètres paysagers) sous Canoco 4.5 (ter Braak & Smilauer 2002).

L'ACC a permis d'expliquer 66% de la distribution des taons et trois variables ont une influence significative : l'exposition, l'altitude et la taille moyenne des zones ouvertes (Figure 7). D'après les tests de corrélation de Spearman, l'altitude (entre 1500 et 2000 m) a eu un effet positif sur *H. auripila* (espèce de montagne dans le sud de l'Europe) et un effet négatif sur *T. bromius* et *P. aprica* (espèces à large distribution). La diversité en espèces et l'abondance de *P. aprica*, *T. bromius* et *T. glaucopsis* furent négativement corrélées avec l'augmentation de la taille moyenne des zones ouvertes et/ou positivement corrélées avec la complexité de forme de ces habitats.

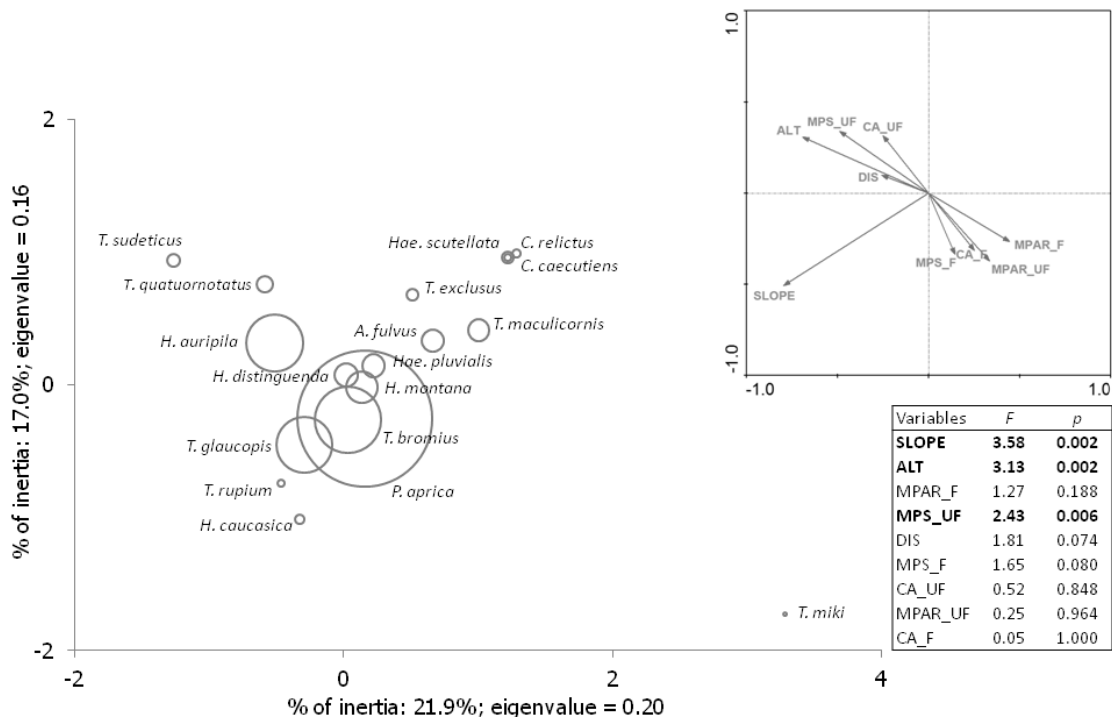


Figure 7. Analyse canonique des correspondances (ACC) : représentation de la distribution des espèces en fonction des différentes variables environnementales

La taille des cercles est proportionnelle à l'abondance totale des collectes pour chaque espèce. Les variables environnementales sont l'exposition (SLOPE), l'altitude (ALT), la distance à la rivière (DIS) et, pour les habitats forestiers (F) et ouverts (UF), la surface totale (CA), la taille moyenne des patch (MPS) et la complexité de la forme des patch (MPAR). L'effet de chaque variable (valeurs F et p) est reporté dans le tableau et les effets significatifs sont notés en gras ($P < 0,01$).

Notre travail a ainsi montré que l'altitude et le paysage ont une influence sur la distribution des taons. Les zones de transition forêt – milieu ouvert sont des habitats préférentiels pour les taons car elles sont situées à faible distance des gîtes larvaires, des aires de recherche d'hôtes et des gîtes de repos pour les adultes (Kingston *et al.* 1986; Barros 2001; Andreeva *et al.* 2009). Or, dans les Pyrénées, comme dans la plupart des montagnes d'Europe, la déprise agricole du siècle dernier a favorisé l'expansion des forêts et la réduction des milieux ouverts (Gracia *et al.* 2011). Ceci pourrait être favorable à une augmentation des populations de taons dans les forêts de moyenne altitude.

En revanche, nous n'avons pas mis en évidence de relation entre la distribution des taons et la distance par rapport à la rivière. Ceci peut s'expliquer par (i) la multiplicité des points d'eau permanents ou temporaires dans chaque vallée (rivière, ruisseaux, tourbières), (ii) la diversité des gîtes larvaires selon les espèces (par exemple, larves de *T. bromius* semi-aquatiques et larves de *P. aprica* terrestres) (Andreeva *et al.* 2009), (iii) et la grande capacité de dispersion des adultes (sauf pour les espèces petites comme *Chrysops* sp. et *Haematopota* sp.) (Chvála *et al.* 1972; Konstantinov 1993).

Dans chaque vallée, nous avons observé une succession des espèces entre fin-juin et fin-août avec un pic d'abondance des taons début août. La période d'activité fut plus courte dans la vallée exposée au sud. Les espèces de montagne comme *H. auripila* sont les plus précoces suivi par des espèces plus communes comme *T. bromius* et *P. aprica*. Cette succession d'espèces a aussi été montrée en Turquie et en République tchèque (Dusbabek 1986; Altunsoy & Kiliç 2012).

En estive, les principales espèces de taons sont actives entre 9h et 19h avec un pic d'activité entre 11h et 13h (GMT+1). En Bulgarie, *T. bromius* était aussi très actif en milieu de journée (12h-15h) (Ganeva 1999). En revanche, sur le Caucase, Chvála (1979) a observé une activité maximale de *Tabanus* spp. et de *Philipomyia* spp. entre 16h et 18h. La température, l'humidité et les vents thermiques pourraient expliquer ce pic d'activité en fin d'après-midi. L'étude de l'influence des variables environnementales sur les piqûres de taons nous permettra d'évaluer la relation entre l'activité des taons et les conditions climatiques (Article 2).

Article 1 : Spatial and temporal distribution of Tabanidae in the Pyrenees Mountains:
the influence of altitude and landscape structure.

F. Baldacchino, A. Porciani, C. Bernard & P. Jay-Robert.

Bulletin of Entomological Research, in press (2013)

<http://dx.doi.org/10.1017/S0007485313000254>

Spatial and temporal distribution of Tabanidae in the Pyrenees Mountains: the influence of altitude and landscape structure

F. Baldacchino^{1*}, A. Porciani¹, C. Bernard²
and P. Jay-Robert¹

¹Dynamique et Gouvernance des Systèmes Ecologiques, Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive (CEFE), UMR 5175, Université Paul-Valéry (UM3), Montpellier, France: ²Système d'Information Géographique en Ecologie, CEFE, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Montpellier, France

Abstract

In high-altitude summer pastures, horseflies (Diptera: Tabanidae) can be a serious nuisance to livestock, as well as mechanical vectors of animal diseases such as besnoitiosis, an enzootic disease in the Pyrenees. However, the activity of horseflies in mountainous environments is poorly documented. To study the seasonality and distribution of tabanids in the Pyrenees Mountains, a sampling design was set up in two valleys on opposite sides of the mountain, one north-facing and one south-facing, along high-elevation gradients and at different distances from a water body between May and October 2011. The influence of the landscape on species richness and abundance was assessed by taking into account forested and unforested areas in 200 m radii around the trapping sites. Our findings indicated that: (1) The slope, the altitude and the size of unforested patches significantly influenced community composition of tabanids. (2) Altitude had a positive or a negative effect, depending on the species. (3) Species richness and abundance were negatively correlated with large open habitats and positively correlated with patch-shape complexity. (4) Seasonal succession of the most abundant species was observed in both valleys, with a maximum of catches at the beginning of August; however, tabanid activity ended earlier in the southern valley, which was more exposed to sunlight. (5) *Philipomyia aprica*, *Tabanus bromius*, *Tabanus glaucopsis* and *Hybomitra auripila* were active from 9:00 to 19:00 h (GMT+1), with a peak of activity at midday. This paper also discusses the implications of these findings in relation to changes in horsefly distribution and their control in mountainous environments.

Keywords: Tabanidae, Pyrenees, elevation, landscape, seasonal abundance, daily activity

(Accepted 28 March 2013)

*Author for correspondence
Phone: + 33 4 67 14 23 21
Fax: + 33 4 67 14 24 59
E-mail: frederic.baldacchino@cefe.cnrs.fr

Introduction

The management of suckler cattle in European mountain conditions is based on long winter housing phases, imposed by the climatic conditions, followed by summer grazing on high-altitude pastures during the period of higher availability and quality of grass (Casasus *et al.*, 2002). However, in

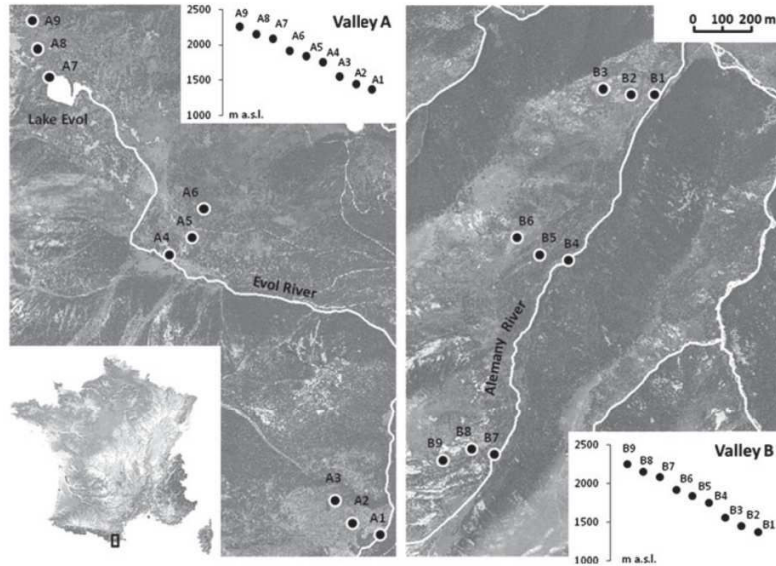


Fig. 1. Studied valleys (A and B) with vertical profiles of the trapping locations. Trapping locations were numbered from 1 to 9.

mountainous areas, cattle are particularly exposed to ectoparasites, especially horseflies (Diptera: Tabanidae). Horseflies are large haematophagous insects that feed on the blood of ungulates and can be a serious nuisance for livestock (Mullen & Durden, 2002). Previous studies have shown that grazing animals are likely to be particularly bothered by tabanids, and when the fly load is high, they may move to habitats with maximal exposure to wind or with mixed vegetation, for example, bushy areas, where tabanids are less active (Hughes *et al.*, 1981; Raymond & Rousseau, 1987). In addition, tabanids are mechanical vectors of pathogens such as *Besnoitia besnoiti*, a sporozoan parasite enzootic to the Pyrenees, but currently considered an emerging disease in Europe (Foil, 1989; EFSA, 2010; Jacquet *et al.*, 2010; Gentile *et al.*, 2012). High-altitude pastures are areas with a high risk of transmission, as sick livestock can mix with healthy livestock in the herd.

The occurrence and activity of tabanids depend on the presence of the host animal, as well as on environmental parameters such as climatic conditions (temperature, humidity and wind) and landscape parameters (water, vegetation and altitude) (Chvála *et al.*, 1972; Sheppard & Wilson, 1977; Hackenberger *et al.*, 2009; Van Hennekeler *et al.*, 2011). Insect communities may be influenced by habitat variation at the scale of a patch and/or the landscape, depending on the focal taxa's body size, home range area and dispersal distances. For example, species richness and abundance of bumblebees in mountainous areas is influenced by both patch and landscape factors (Hatfield & LeBuhn, 2007).

In Europe, most ecological studies dealing with tabanids have been conducted in plains habitats, with only a few studies carried out in mountainous areas (Chvála, 1979; Hackenberger *et al.*, 2009). However, Koerner (2007) underlined the importance of altitude in ecological research, and

altitude has been virtually proven to influence the distribution of insects (McCoy, 1990; Hodkinson, 2005; Pyke *et al.*, 2011). Moreover, the richness of Tabanidae fauna in European mountains (the Alps and the Pyrenees) was shown by Leclercq (1971, 1977) who has attempted to characterize the altitudinal distribution of species.

The eastern Pyrenees are an ideal study site for evaluating the influence of environmental variables on diversity and abundance of tabanids. The climate of this region is influenced by both Mediterranean and oceanic climatic conditions (Esteban *et al.*, 2009). The transversal aspect of the main valleys in relation to the north–south axis results in two clearly contrasted slopes, one dry and one wet. Furthermore, agricultural and pastoral activities have created a structured mosaic of landscapes, modified by the expansion of forest areas over the last few decades (Gracia *et al.*, 2011). The selection of this area for our study allowed us to consider the effects of different altitudes along high-elevation gradients, the effects of distance from water bodies – which are known as breeding sites for tabanids – and the effects of landscape factors on the distribution of tabanids. Seasonality and daily activity patterns of the main species present were also recorded.

Materials and methods

Study sites

Two sampling valleys (A and B) of summer pasture grounds on opposite slopes were selected in the eastern Pyrenees, France (fig. 1). Valley A is located in the summer pastures of La Mouline, ranging from 850 to 2300 m above sea level on the southeast slope of the Madres massif (2°14'E, 42°37'N). The climate is influenced by Mediterranean and

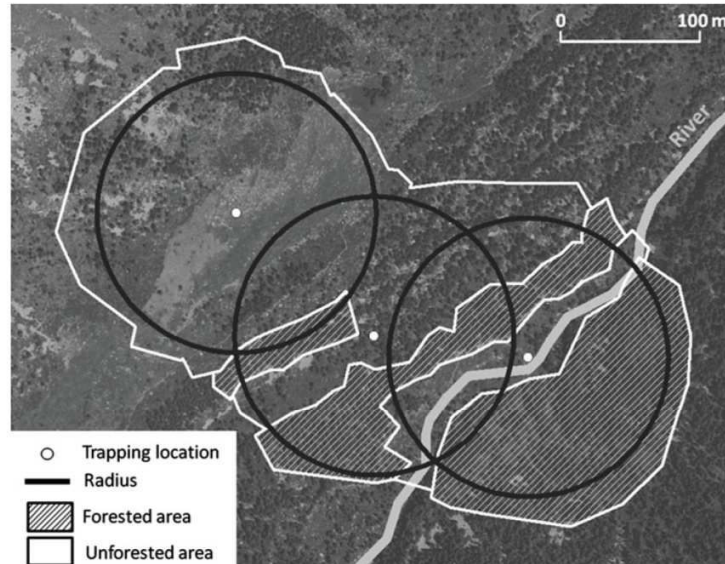


Fig. 2. Example of 200 m radii around three trapping locations. Polygon-shaped patches of forested and unforested habitats were delineated using aerial photographs.

alpine conditions, with a mean annual temperature of 10.8°C and annual rainfall of 753 mm (Nohèdes village, 1000 m a.s.l., at a distance of 4 km) (Roux *et al.*, 2011). This area is in the centre of the Madres-Coronat Natura 2000 site (FR9101473) and includes Evol Lake ('Gorg Negre') at 2083 m a.s.l. It is characterized by dense grassland (*Isoetes echinospora*) around the lake, peat bogs, forests of mountain pine (*Pinus mugo*) and granitic scree.

Valley B is located in the Mantet Natural Reserve, ranging from 1450 to 2700 m a.s.l. on the northwest slope of the Costabona massif (2°18'E, 42°28'N). The climate is influenced by both moderate Atlantic and orogenic continental conditions with a mean annual temperature of 9.5°C and annual rainfall of 855 mm (Mantet village, 1545 m a.s.l.) (Mantet Natural Reserve data, unpublished). This area is characterized by metamorphic rocks from the Mantet-Fillos rift. It is a complex mosaic of woodlands (*Pinus uncinata* and *Betula* spp.), moorland (*Cytisus oromediterraneus*), rocks, pastures and grasslands. Wetlands and aquatic habitats are poorly represented.

Sampling

Figure 1 represents the two valleys with the vertical profile of the trapping locations. To evaluate the altitudinal effect, three transects at different altitude levels were designated in each valley: low (A1–A3: 1373–1554 m, B1–B3: 1580–1732 m), medium (A4–A6: 1757–1921 m, B4–B6: 1824–1932 m) and high (A7–A9: 2087–2258 m, B7–B9: 2101–2205 m). Along each transect, three locations were fixed at an increasing distance from the nearest river (0 m, 200 m and 400 m) to evaluate the influence of the proximity of water bodies. In both valleys, the respective rivers were considered the main water

body, except for the highest altitude level of valley A, where the transect starts at the shore of the lake.

Mapping

To evaluate the influence of landscape factors, aerial photographs were analysed using ArcMap 9.3 (ESRI Inc., California, USA). Radii of 200 m were overlaid on trapping locations (fig. 2). The radii were quite large in size because tabanids are strong, fast fliers. Studies conducted on tabanid dispersal have shown that the mean daily flying distance is less than 1–2 km, although unfed tabanids may disperse over distances of more than 6 km (Sheppard & Wilson, 1976; Cooksey & Wright, 1987; Konstantinov, 1993; Barros & Foil, 2007). In each radius, polygon-shaped patches of homogeneous habitat were delineated according to the vegetation cover using aerial orthophotography from 2009 and classified into two land-cover classes: forested and unforested (fig. 2). Forested patches corresponded to conifer forests, and unforested patches corresponded to open areas such as grasslands, pastures, moors, bushes, rock, water or mixed vegetation.

Landscape metrics were calculated in each radius using the patch analyst extension for ArcGis 9.x. In each radius, forested and unforested patches were characterized by their total surface area (CA, ha), the mean patch size (MPS, ha) and their mean perimeter–area ratio (MPAR, $m\ ha^{-1}$) as an indicator of the patch-shape complexity (table 1).

Around trapping locations, the landscape was largely dominated by unforested habitat. The number of forested and unforested patches was quite similar, but the MPS was four times higher for unforested patches. Conversely, the MPAR was two times higher for forested patches.

Spatial and temporal distribution of Tabanidae in the Pyrenees Mountains

4

F. Baldacchino *et al.*

Table 1. Landscape parameters extracted from thematic maps for each radius with the mean and standard deviation for each class (forested vs unforested).

Classification	Parameter (abbreviation)	Class	Mean	SD	Unit
Area	Class area (CA)	Forested	2.83	2.47	ha
		Unforested	9.73	2.47	ha
Patch density and size metric	Mean patch size (MPS)	Forested	1.87	1.96	ha
		Unforested	7.68	3.94	ha
Shape metric	Mean perimeter–area ratio (MPAR)	Forested	726.2	708.2	m ha ⁻¹
		Unforested	373.3	508.3	m ha ⁻¹

Trapping

One Nzi trap (Mihok, 2002) and one Vavoua trap (Laveissiere & Grebaut, 1990) were used at each trapping location. The distance between traps was about 10 m. The traps were made from blue and black components (SuperMaine 300 g cotton/polyester 65/35, TDV Industries, France) and polyester mosquito netting. Aged cow urine (50 ml) was used as the attractant and placed under each trap in plastic vials with a 2.5-cm aperture. The front of each Nzi trap was positioned facing west. A total of eight collections in each valley were made over the period of May to September 2011. Each collection was conducted over a continual 48-hour period. Tabanids were identified using Chvála's key (Chvála 1972). Each sampling unit (SU) consisted of the total catches obtained in a pair of Nzi-Vavoua traps during a 48-hour session. Then, all the abundance data per species from the 72 SUs (8 collections × 9 trapping locations per valley) were used to analyse the spatial and temporal distribution of tabanids.

Daily activity pattern

To investigate the daily activity pattern of tabanids, collections were made in selected locations on selected days and times. In valley A, collections were made at three locations (A3, A4 and A7) on 1 August 2011, and in valley B at five locations (B1, B2, B4, B5 and B6) on 11 August 2011 and at three locations (B7, B8 and B9) on 7 July 2012. Species were collected during six consecutive 2-hour periods from 7:00 to 19:00 h (GMT+1). Only one Nzi trap baited with aged cow urine was used at each location.

The results took account of all trapping locations in valley A and B during the three collection days. The percentages of the total number of each species were calculated for each 2-hour period.

Statistical analyses

Differences in catches between Nzi traps and Vavoua traps were compared using the non-parametric Wilcoxon signed-rank test (*W*). Species accumulation curves for each valley were constructed using EstimateS (Colwell *et al.*, 2012). A correspondence analysis and a canonical correspondence analysis (CCA) were performed per trapping location on abundance log-transformed data using Canoco 4.5 (ter Braak & Smilauer, 2002). For the CCA, the environmental data-set consisted of a matrix of nine variables: the slope (valley A vs valley B), the altitude, the distance from the river and the three landscape metrics (CA, MPS and MPAR) calculated for forested (F) and unforested (UF) patches (table 1). During the

CCA, Monte Carlo permutations ($n=499$) were performed in order to identify the subset of environmental variables that exerted a significant influence on tabanids distribution at $P<0.01$. Correlations between the total number of species or the abundance of main species and (i) the altitude, (ii) the distance from the river and (iii) the landscape metrics were evaluated using Spearman's rank-order correlations coefficient (r_s) with Monte Carlo permutations ($n=9999$). Statistical tests were performed with PAST 2.12 (Hammer *et al.*, 2001).

Results

Effectiveness of traps

A total of 2020 tabanids (2019 females and one male) belonging to 19 species in six genera (*Philipomyia*, *Tabanus*, *Hybomitra*, *Atylotus*, *Haematopota* and *Chrysops*) were captured over the period of the study (table 2). Most of the insects, including the only male, were *Philipomyia aprica* (Meigen 1820) (55.8%). Other abundant species were *Tabanus bromius* Linnaeus 1758 (13.4%), *Hybomitra auripila* (Meigen 1820) (9.8%) and *Tabanus glaucopsis* Meigen 1820 (9.2%).

The Nzi traps consistently caught more tabanids than the Vavoua traps, with a total of 1824 specimens (90%): *Philipomyia* spp. (88%, $W=36$, $P=0.01$), *Tabanus* spp. (92%, $W=21$, $P=0.04$), *Hybomitra* spp. (88%, $W=15$, $P=0.09$) and *Atylotus* spp. (83%, $W=12$, $P=0.27$). Nzi traps seemed less effective for *Chrysops* spp. (63%, $W=3$, $P=0.6$) and *Haematopota* spp. (28%, $W=6$, $P=0.33$), and very few specimens of these two genera were collected.

Spatial distribution

During the study, we collected more species but less specimens in valley A ($N=18$, $n=731$) than in valley B ($N=13$, $n=1289$). Catches of the four main species were more numerous in valley B. Species accumulation curves show that the sampling effort was quite sufficient for estimating species richness in both valleys and that species richness was higher in valley A (fig. 3).

The initial correspondence analysis revealed that trapping location A7, close to the lake, was an outlier (fig. 4). Therefore, a second correspondence analysis was done without this sample. Locations in valleys A and B were separated along the first axis, while higher locations (A8, A9, B8 and B9) were clustered along the second axis. To investigate community composition in relation to environmental variables, a CCA was performed (fig. 5). The A7 sample was not included in the analysis and two samples were downweighted as they were detected as outliers with a high influence. The results of the CCA were significant, explaining 66.2% ($P=0.002$) of tabanids

Table 2. List of collected Tabanidae species and the number of individuals of each species.

Species	Valley A, n	Valley B, n	Total, n
<i>P. aprica</i> (Meigen 1820)	468	659	1127
<i>T. bromius</i> Linnaeus 1758	68	202	270
<i>H. auripila</i> (Meigen 1820)	31	166	197
<i>T. glaucopsis</i> Meigen 1820	9	177	186
<i>Hybomitra montana</i> (Meigen 1820)	28	32	60
<i>Hybomitra distinguenda</i> (Verrall 1909)	17	16	33
<i>Haematopota pluvialis</i> (Linnaeus 1758)	25	6	31
<i>Athylotus fulvus</i> (Meigen 1804)	26	3	29
<i>Tabanus maculicornis</i> Zetterstedt 1842	26	1	27
<i>Tabanus quatuornotatus</i> Meigen 1820	4	13	17
<i>Tabanus sudeticus</i> Zeller 1842	3	7	10
<i>Tabanus exclusus</i> Pandelle 1883	8	0	8
<i>Chrysops relictus</i> Meigen 1820	8	0	8
<i>Hybomitra caucasica</i> (Enderlein 1925)	1	4	5
<i>Haematopota scutellata</i> (Olsufjev, Moucha & Chvála 1964)	4	0	4
<i>Tabanus rupium</i> (Brauer 1880)	0	3	3
<i>Chrysops caecutiens</i> (Linnaeus 1758)	3	0	3
<i>Tabanus miki</i> Brauer 1880	1	0	1
<i>Chrysops sepulcralis</i> (Fabricius 1794) ¹	1	0	1
Total	731	1289	2020

¹ Specimen not collected in a trap.

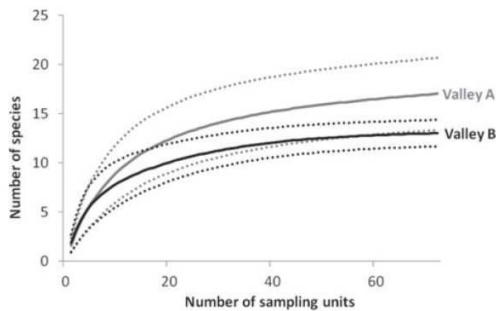


Fig. 3. Species accumulation curves for valleys A and B (each is shown with its 95% confidence interval).

distribution. The results indicated that three variables significantly influenced fauna: slope, altitude and the mean patch size of unforested patches ($P < 0.01$).

The relationships between the number of taxa or the abundance of the main species and (i) the altitude, (ii) the distance from the river and (iii) the landscape context were also assessed by Spearman's correlation analysis. All the significant results are summarized in table 3. They show that (i) no correlation occurred between the diversity of tabanids and altitude. However, the abundance of *P. aprica* and *T. bromius* were negatively correlated with altitude in valleys A and B, whereas *H. auripila* was positively correlated with altitude in valley B. (ii) Distance from the river had no perceptible effect on the catches. (iii) Species richness was positively correlated with the size of forested patches, and negatively correlated with the surface covered by unforested habitats. The shape complexity of unforested patches also had a positive effect on the number of taxa. In both valleys, the

abundance of *P. aprica* was positively correlated with the shape complexity of unforested patches, but negatively correlated with the size of unforested patches. In valley B, the size of unforested patches had a negative effect on the abundance of *T. bromius* and *T. glaucopsis*, and the shape complexity of unforested patches had a positive effect on the abundance of *T. bromius*.

Seasonal abundance and daily activity

In both valleys, tabanids were active from early June to early September – only a few specimens were collected in late May and late September. The largest number of individuals and species were collected in early August in valley A and in mid-August in valley B (fig. 6). There was a seasonal succession of the four main species. *H. auripila* was the first species collected in abundance, with a peak in late June in both valleys; *P. aprica* was active from late July to mid-August, with the shortest flight period in valley A; *T. bromius* had the longest flight period, from late June to mid-August, with a peak in abundance in early August in valley A, extending to mid-August in valley B. The last to appear was *T. glaucopsis*, which peaked in abundance in mid-August in valley B.

Tabanids were active from 9:00 to 19:00h (fig. 7). The diurnal activity of *H. auripila*, *P. aprica*, *T. bromius* and *T. glaucopsis* was characterized by a one-peak curve which reached a maximum between 11:00 and 13:00 h (GMT+1). During this period, 40–50% of tabanids were collected.

Discussion

Efficiency of traps and daily flight activity

Our results showed that Nzi traps were more effective than Vavoua traps for sampling Tabanidae species. The efficiency of these traps has been previously demonstrated in Africa, North America and Australia (Mihok, 2002; Mihok *et al.*, 2006;

Spatial and temporal distribution of Tabanidae in the Pyrenees Mountains

6

F. Baldacchino *et al.*

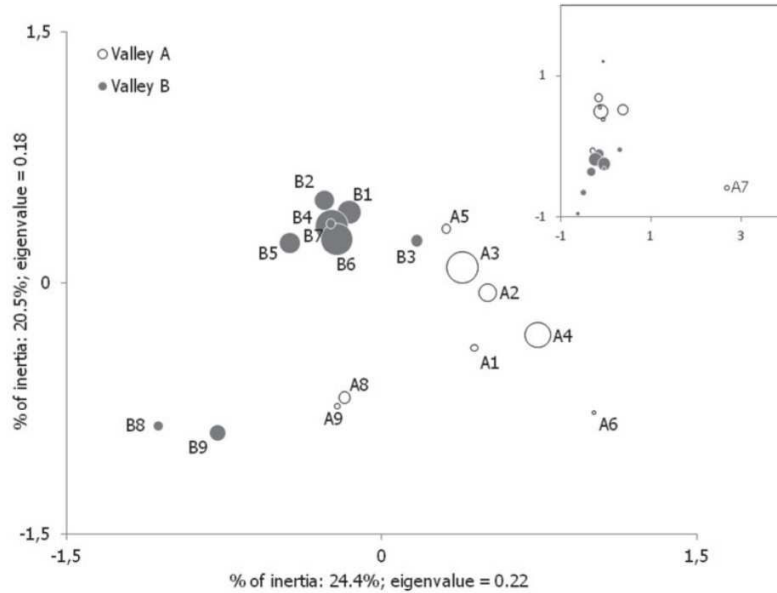


Fig. 4. Plot of trapping locations (without A7) on axes 1–2 of the correspondence analysis (the size of each circle is proportional to the total abundance of catches at each location). The plot of trapping locations including A7 is represented in the inset.

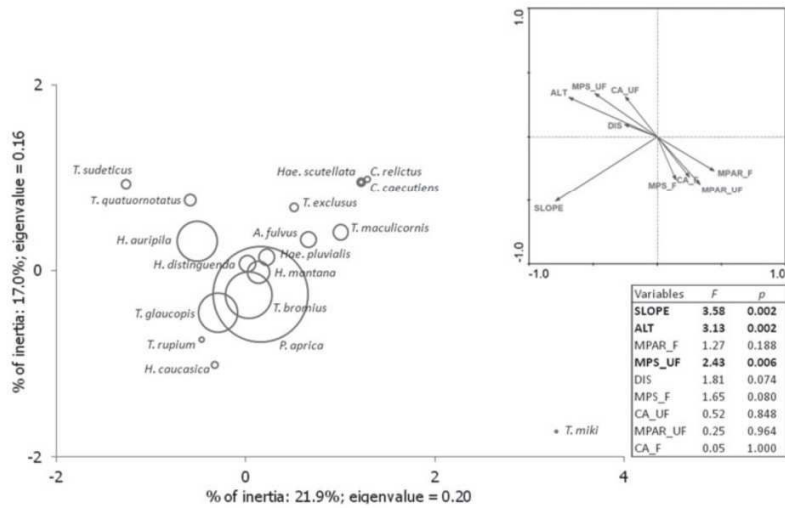


Fig. 5. CCA biplot of the species and the environmental variables (inset). The size of each circle is proportional to the total abundance of catches of each species; complete names in table 2. The environmental variables are the slope of the valley (SLOPE), the altitude (ALT), the distance from the river (DIS), the class area (CA), the mean patch size (MPS) and the mean perimeter area ratio (MPAR) for forested (F) and unforrested (UF) patches. The conditional effect (*F* and *P* values) after Monte Carlo permutation is reported for each variable. Significant levels are in bold ($P < 0.01$).

Table 3. Landscape parameters with significant positive or negative effects on species richness and abundance of tabanids using Spearman's rank-order correlation ($P \leq 0.05$, Monte Carlo permutation test based on 9999 random replicates)

Species richness/species	Parameters (Class)	Spearman r_s	P-value	Valley
Number of species	CA (unforested)	-0.55	0.020	A,B
Number of species	MPS (forested)	0.52	0.028	A,B
Number of species	MPS (unforested)	-0.52	0.027	A,B
Number of species	MPAR (unforested)	0.48	0.041	A,B
<i>P. aprica</i>	Altitude	-0.51	0.029	A,B
<i>P. aprica</i>	MPS (unforested)	-0.52	0.028	A,B
<i>P. aprica</i>	MPAR (unforested)	0.52	0.026	A,B
<i>T. bromius</i>	Altitude	-0.55	0.018	A,B
<i>T. bromius</i>	MPS (unforested)	-0.69	0.044	B
<i>T. bromius</i>	MPAR (unforested)	0.71	0.038	B
<i>H. auripila</i>	Altitude	0.77	0.020	B
<i>T. glaucopsis</i>	MPS (unforested)	-0.67	0.050	B

Van Hennekeler *et al.*, 2008). In studies carried out in southeastern France, Nzi traps captured a large number of tabanids in the plain (Baldacchino *et al.*, 2012). Nzi traps seem to be particularly attractive to flies as opposed to other insects, as in addition to horseflies, *Haematobosca stimulans* (Meigen 1824) (Diptera: Muscidae) and other muscid flies that annoy livestock, were also caught (Baldacchino, unpublished data).

Given the high efficiency of the Nzi traps, they were used to estimate the flying activity of tabanids during the day. In the eastern Pyrenees, the four main species, *P. aprica*, *T. bromius*, *T. glaucopsis* and *H. auripila*, were all active from 9:00 to 19:00 h, with a marked peak between 11:00 and 13:00 h (GMT+1). In studies carried out in southern Bulgaria, the major peak of activity for *T. bromius* was recorded between 12:00 and 15:00 h (Ganeva, 1999), while in the eastern Caucasus (about 1000 m a.s.l.), *Tabanus* sp. and *Philipomyia* sp. had a conspicuous peak between 16:00 and 18:00 h (Chvála, 1979). Chvála suggested that temperature, relative humidity and thermal winds in the mountains were decisive factors influencing the late afternoon peak of tabanid activity, yet our findings contrasted with these observations. Since meteorological conditions influence the flying activity of tabanids (Van Hennekeler *et al.*, 2011), one might hypothesize that cold temperatures induced by high elevations (our study ranged from 1300 to 2300 m a.s.l.) restricted the favourable period for flight. Our findings revealed that the four main species had a similar pattern of daily activity with a peak at midday, but other tabanid species are known to be active in early or late afternoon, or early in the evening (Chvála, 1979; McElligott & Galloway, 1991; Oliveira *et al.*, 2007). Furthermore, some species have a crepuscular activity, such as *Tabanus equalis* Hine 1923 in Oklahoma (Hollander & Wright, 1980) or *Tabanus paradoxus* Jaenicke 1866 in Europe (Chvála *et al.*, 1972), or exhibit a bimodal pattern of activity, such as *Haematopota* sp. in Uganda (Harley, 1965).

Influence of elevation on species richness and abundance

Insects vary in their population response to altitude (Hodkinson, 2005), yet the influence of elevation on tabanids has been poorly studied. In Tennessee, studies have shown that many species are prevalent only at higher altitudes (600 m a.s.l.), while most species common at lower altitudes (250 m a.s.l.) were also fairly common in upland locations

(Mullens & Gerhardt, 1980). In Croatia, research has found that tabanid abundance and species richness are partially determined by altitude or vegetation along a transect rising from sea level to 1157 m (Hackenberger *et al.*, 2009). In Armenia and the mountainous Nakhitchevan region (1400–1700 m a.s.l.), the flight activity of *Tabanus infestus* Bogatchev & Samedov 1949 has also been found to depend on altitude (Dolin & Andreeva, 1983).

In our study, the CCA showed that altitude had a significant influence on tabanids distribution, as well as a significant effect on the abundance of three out of four main species (positively for *H. auripila*, negatively for *P. aprica* and *T. bromius*), but had no significant effect on species richness. These findings were congruent with published data. *H. auripila*, observed from Scandinavia to Spain, occurs at low altitude in northern latitudes, but in southern Europe is restricted to mountains. On the other hand, *P. aprica* is a typical species of hilly regions, occurring from Spain to Belgium, while *T. bromius* is a ubiquitous species widely distributed throughout the western Palaearctic from Scandinavia to North Africa (Chvála *et al.*, 1972). All these species have previously been observed up to 2000 m a.s.l. in European mountains (Leclercq, 1977).

Slope orientation and seasonal dynamics

The mix of species was different in the two valleys. The CCA showed that community composition of tabanids species was significantly influenced by slope. In the south-facing valley (A), species richness was high, but *P. aprica* largely dominated (64% of catches). Conversely, the evenness was high among the 17 remaining species (Shannon evenness = 0.82). Some typical species were observed close to the lake, such as *Chrysops* and *Haematopota* species, which are known to occur in this type of biotope and do not fly far from the places where the larvae live (Chvála *et al.*, 1972). This explains why trapping location A7 was an outlier with respect to community composition.

The north-facing valley was characterized both by lower diversity and by a lesser degree of domination of *P. aprica* (51%), which was associated with three other abundant species (*T. bromius*, *T. glaucopsis* and *H. auripila*). Together, these four species represented more than 93% of the catches. Such a contrast in fauna related to exposure to sunlight has

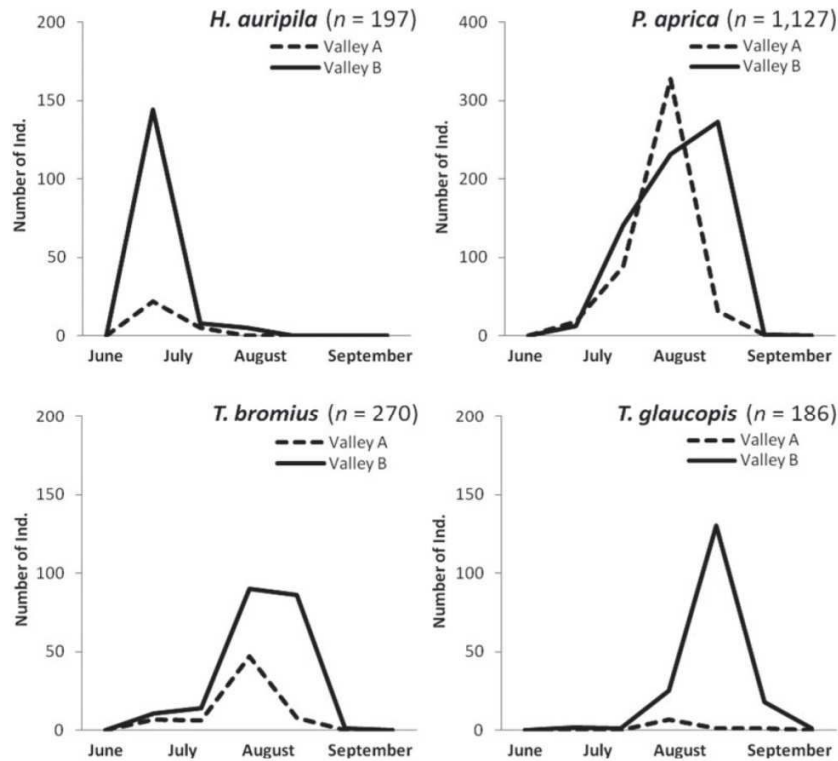


Fig. 6. Catches of the four main species from June to September 2011 in valleys A and B.

been previously shown at lower elevations in the eastern Mediterranean basin, in a study carried out in the Velika Kapela mountains in Croatia (Hackenberger *et al.*, 2009).

A seasonal succession of the main species was observed and may be associated with a strategy to reduce interspecific competition (Barros, 2001). *H. auripila* was active very early in the summer, *T. bromius* and *P. aprica* were active between late July and early August and *T. glaucopsis* was active starting from early August. The propitious period for tabanid activity was shorter in the south-facing valley, where 66% of insects were caught during the fifth trapping session (30 July). Conversely, the apparent abundance of tabanids in the north-facing valley (ratio of total catches in valley B/valley A = 1.8) can be explained by the length of the period of activity.

The seasonal dynamics of the most abundant species were consistent with previous studies. In North America, *Hybomitra* species were most active from late May to early July (Mullens & Gerhardt, 1980; McElligott & Lewis, 1998). In the Czech Republic, *H. auripila* emerged first, in June, whereas *T. bromius* emerged in July (Dusbabek, 1986). In Turkey, *Hybomitra* sp. were also the first species to emerge, in late May, whereas *T. bromius* and *P. aprica* peaked in July, with *T. glaucopsis* emerging in late July and reaching its peak in mid-August (Kilic, 1993; Altunsoy & Kilic, 2012). In Croatia, *T. bromius* was most active in mid-July or early August, depending on

whether the location was pasture or forest (Krčmar, 2005). In 2007, Hackenberger *et al.* (2009) observed even earlier activity of *T. bromius* in the Velika Kapela mountains (peak of activity in June) and suggested the explanation might have been that the temperature was 3°C above the seasonal average. Hence, seasonal meteorological variability may have a significant influence on the duration of tabanid flight activity, on when they emerge and on their peak of abundance (Krčmar, 2005).

Influence of water bodies and landscape structure

Our study indicated that distance from water (in this case, a river) did not significantly influence the community composition of tabanids. For most tabanid species, the ecological requirements of larvae are poorly known. Wet hollows or somewhat drier edaphic conditions should be suitable laying places for some species, and one might expect that the 19 species observed during the study belong to different ecological groups (Chvála *et al.*, 1972; Andreyeva, 1982; Andreeva *et al.*, 2009). Some species, such as *P. aprica* or *T. glaucopsis*, do not depend on aquatic biota for larval development, however, others, such as *T. bromius*, are semi-hydrophilous at larval stage and lay their eggs in slow-moving water bodies (Chvála *et al.*, 1972). Similarly, the presence of *H. auripila* adults near biota such as peat bogs and marshes

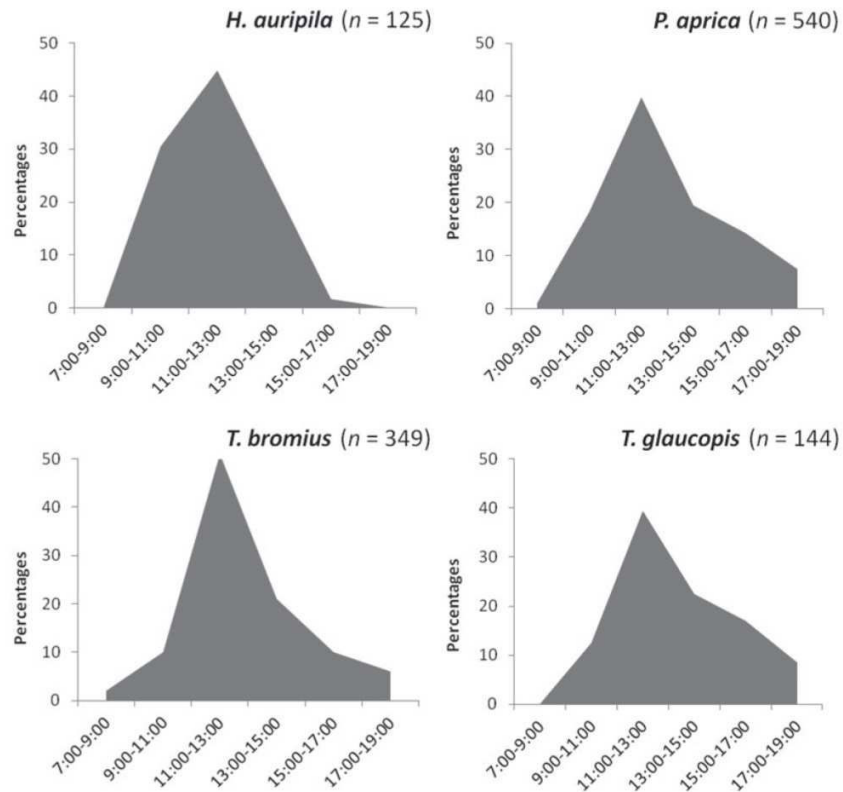


Fig. 7. Daily activity of the four main species between 7:00 and 19:00 h (GMT + 1). The figures show the percentages of the total number of specimens collected during six consecutive 2-hour periods.

suggest that the larvae may be hydrophilous (Chvála *et al.*, 1972). However, given their strong flying ability, (semi-) hydrophilous species are seemingly able to disperse widely, and adults can be collected far from breeding sites.

Although our study did not reveal any significant effect of the presence of a river on the prevalence of tabanids, the community composition was found to be significantly influenced by the distribution of forested and unforested patches in the mosaic of habitats (MPS unforested, $P < 0.01$). Specifically, landscape parameters showed that species richness and abundance of *P. aprica*, *T. bromius* and *T. glaucopis* (78% of total catches) decreased in relation to an increase in the size of clearings, and was enhanced by patch-shape complexity. Therefore, pastures dominated by grasslands and shrubs with patches of forested areas appeared to favour tabanids.

Forested areas are preferential resting sites for tabanids (Okiwelu, 1977). In a mark-recapture study in Texas, *Tabanus abactor* Philip 1936 was found in greater numbers in habitats with cover (e.g. dense leaves and branches) than in areas lacking cover (Kingston *et al.*, 1986). In contrast, open areas are more suitable for host-seeking activity, as a target host

tends to attract over a wider range in an open habitat than in a forested one (Barros, 2001).

A study in southern Louisiana showed that *Tabanus* sp. had the greatest host-seeking activity near the edge of a wood, and that this activity decreased significantly at over 200 m from the edge of the wood or more than 20 m into the wood (Sheppard & Wilson, 1977). This preference for pasture-forest ecotone habitats may explain the higher abundance of tabanids trapped in forest clearings than in primary forest in a study in the Amazon (Ferreira-Keppler *et al.*, 2010), and that, in an Ivory Coast study, the largest numbers of tabanids were caught in gallery forests, and the fewest in primary forest (Acapovi, 2001).

Conclusion

The size and physical arrangement of habitat patches in landscapes play a fundamental role in determining the abundance and diversity of insect fauna (Hunter, 2002). Moreover, the complexity of the border between patches at any scale may be as important as the content of the patch, from 'a fly's point of view' (Haslett, 2001). Our study demonstrates

that tabanid distribution was influenced by altitude and forest cover, and particularly by the size and shape complexity of the unforested patches. Our findings indicate that horseflies' preferential habitats are at the edges of their breeding sites, host-seeking areas and resting sites. In the Pyrenees Mountains, the decrease in agro-sylvo-pastoral activities during the last century has favoured the expansion of forest areas and a reduction in open habitats (Gracia *et al.*, 2011). This change may have an influence on the distribution of tabanids in the future, potentially extending their range of activity.

During their period of activity, tabanids reached the maximal peak of abundance in the middle of the summer. Hence, management of grazing areas relative to seasonal occurrence may be an element to consider in integrated management of tabanids (Foil & Hogsette, 1994). Selective grazing in large open areas, well away from wooded habitats and at high elevation levels, may reduce biting activity on livestock during mid-summer. This management could be associated with mechanical control of the population of horseflies using an effective method. Nzi traps have been shown to collect great numbers of tabanids. The setting of such traps close to the pasture-forest ecotone habitats may decrease the populations of tabanids. Such an approach is a potential alternative to the use of insecticides, which are not considered to be very effective against horseflies (Mullen & Durden, 2002), are ecotoxic and have a negative impact on populations of dung-dependent arthropods (Wardhaugh, 2005).

Acknowledgements

We would like to thank Claude Guisset of the Mantet Nature Reserve, Karine Geslot of the Jujols Nature Reserve and Alain Mangeot of the Nohèdes Nature Reserve for their invaluable help and useful input. We thank also Hélène Guis, Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), for useful discussions and anonymous reviewers for critical and helpful comments on the manuscript. We are grateful to those who gave us technical assistance in the field: Alain, Lyse, Marion, Jean-Philippe, Lucile and Steve.

References

Acapovi, G.L. (2001) Abundance relative des tabanidés dans la région des savanes de Côte d'Ivoire. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux* **54**, 109–114.

Altunsoy, F. & Kilic, A.Y. (2012) Seasonal abundance of horse fly (Diptera: Tabanidae) in Western Anatolia. *Journal of the Entomological Research Society* **14**, 95–105.

Andreeva, V.R., Kilic, A.Y. & Altunsoy, F. (2009) New contribution to information about Tabanidae (Diptera) adult and larvae from West Anatolia. *Journal of the Entomological Research Society* **11**, 19–30.

Andreyeva, R.V. (1982) On ecologo-morphological typing of tabanid larvae (Diptera, Tabanidae). *Entomological Review* **64**, 49–54.

Baldacchino, F., Cadier, J., Porciani, A., Buatois, B., Dormont, L. & Jay-Robert, P. (2012) Behavioural and electrophysiological responses of females of two species of tabanid to volatiles in urine of different mammals. *Medical and Veterinary Entomology* **27**, 77–85.

Barros, A.M. (2001) Seasonality and relative abundance of Tabanidae (Diptera) captured on horses in the Pantanal, Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* **96**, 917–923.

Barros, A.T.M. & Foil, L.D. (2007) The influence of distance on movement of tabanids (Diptera: Tabanidae) between horses. *Veterinary Parasitology* **144**, 380–384.

Casasus, I., Sanz, A., Villalba, D., Ferrer, R. & Revilla, R. (2002) Factors affecting animal performance during the grazing season in a mountain cattle production system. *Journal of Animal Science* **80**, 1638–1651.

Chvála, M. (1979) Daily activity of Tabanidae in the Caucasus. *Angewandte Parasitologie* **20**, 38–45.

Chvála, M., Lyneborg, L. & Moucha, J. (1972) *The Horse Flies of Europe (Diptera, Tabanidae)*. Copenhagen, Entomological Society of Copenhagen.

Colwell, R.K., Chao, A., Gotelli, N.J., Lin, S.Y., Mao, C.X., Chazdon, R.L. & Longino, J.T. (2012) Models and estimators linking individual-based and sample-based rarefaction, extrapolation and comparison of assemblages. *Journal of Plant Ecology-UK* **5**, 3–21.

Cooksey, L.M. & Wright, R.E. (1987) Flight range and dispersal activity of the host-seeking horse fly, *Tabanus abactor* (Diptera, Tabanidae), in north central Oklahoma. *Environmental Entomology* **16**, 211–217.

Dolin, V.G. & Andreeva, R.V. (1983) Ecology and morphology of *Tabanus infestus* (Tabanidae). *Parazitologiya* **17**, 304–307.

Dusbabek, F. (1986) Composition and seasonal dynamics of the horse-flies fauna (Tabanidae) in a future flood region of Hnevkovice Dam Lake. *Dipterologica Bohemoslovaca* **IV**, 91–93.

European Food Safety Authority (2010) Bovine Besnoitiosis: an emerging disease in Europe. *EFSA Journal* **8**, 1–15.

Esteban, P., Ninyerola, M. & Prohom, M. (2009) Spatial modelling of air temperature and precipitation for Andorra (Pyrenees) from daily circulation patterns. *Theoretical and Applied Climatology* **96**, 43–56.

Ferreira-Keppeler, R.L., Rafael, J.A. & Guerrero, J.C.H. (2010) Seasonality and landscape use by Tabanidae Species (Diptera) in the Central Amazon, Brazil. *Neotropical Entomology* **39**, 645–654.

Foil, L.D. (1989) Tabanids as vectors of disease agents. *Parasitology Today* **5**, 88–96.

Foil, L.D. & Hogsette, J.A. (1994) Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies. *Revue Scientifique et Technique* **13**, 1125–1158.

Ganeva, D. (1999) Daily activity of *Tabanus bromius* L., *Tabanus tergstinus* Egg. and *Haematopota pluvialis* L. (Tabanidae, Diptera) in the Stara Zagora district. *Periodicum Biologorum* **101**, 215–220.

Gentile, A., Militerno, G., Schares, G., Nanni, A., Testoni, S., Bassi, P. & Gollnick, N.S. (2012) Evidence for bovine besnoitiosis being endemic in Italy-First *in vitro* isolation of *Besnoitia besnoiti* from cattle born in Italy. *Veterinary Parasitology* **184**, 108–115.

Gracia, M., Meghelli, N., Comas, L. & Retana, J. (2011) Land-cover changes in and around a National Park in a mountain landscape in the Pyrenees. *Regional Environmental Change* **11**, 349–358.

Hackenberger, B.K., Jaric, D. & Krčmar, S. (2009) Distribution of tabanids (Diptera: Tabanidae) along a two-sided altitudinal transect. *Environmental Entomology* **38**, 1600–1607.

Hammer, Ø., Harper, D.A.T. & Ryan, P.D. (2001) PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica* **4**, 2–9.

Harley, J.M.B. (1965) Seasonal abundance and diurnal variations in activity of some *Stomoxys* and Tabanidae in Uganda. *Bulletin of Entomological Research* **56**, 319–332.

- Haslett, J.R. (2001) Biodiversity and conservation of Diptera in heterogeneous land mosaics: a fly's eye view. *Journal of Insect Conservation* 5, 71–75.
- Hatfield, R.G. & LeBuhn, G. (2007) Patch and landscape factors shape community assemblage of bumble bees, *Bombus* spp. (Hymenoptera : Apidae), in montane meadows. *Biological Conservation* 139, 150–158.
- Hodkinson, I.D. (2005) Terrestrial insects along elevation gradients: species and community responses to altitude. *Biological Reviews* 80, 489–513.
- Hollander, A.L. & Wright, R.E. (1980) Daily activity cycles of 8 species of Oklahoma Tabanidae (Diptera). *Environmental Entomology* 9, 600–604.
- Hughes, R.D., Duncan, P. & Dawson, J. (1981) Interactions between Camargue horses and horseflies (Diptera: Tabanidae). *Bulletin of Entomological Research* 71, 227–242.
- Hunter, M.D. (2002) Landscape structure, habitat fragmentation, and the ecology of insects. *Agricultural and Forest Entomology* 4, 159–166.
- Jacquiet, P., Lienard, E. & Franc, M. (2010) Bovine besnoitiosis: epidemiological and clinical aspects. *Veterinary Parasitology* 174, 30–36.
- Kilic, A.Y. (1993) A study on the seasonal activities of *Tabanus bromius* L., *T. exclusus* Pand., *T. glaucopsis* Meig., *T. spodopterus ponticus* Ols., Mch., Chv., *Philipomyia aprica* (Meig.) (Diptera: Tabanidae) in Eskisehir Region. *Doga-Turkish Journal of Zoology* 17, 303–310.
- Kingston, S.R., Wangberg, J.K. & Sanders, D.P. (1986) Flight behavior and nocturnal resting sites of *Tabanus abactor* Philip (Diptera, Tabanidae) in the Texas rolling plains. *Journal of the Kansas Entomological Society* 59, 337–342.
- Koerner, C. (2007) The use of 'altitude' in ecological research. *Trends in Ecology and Evolution* 22, 569–574.
- Konstantinov, S.A. (1993) The attack distance and the range and nature of the daily flight dispersion of horseflies in the genus *Hybomitra* (Diptera: Tabanidae). *Parazitologija* 27, 419–426.
- Krčmar, S. (2005) Seasonal abundance of horse flies (Diptera: Tabanidae) from two locations in eastern Croatia. *Journal of Vector Ecology* 30, 316–321.
- Laveissiere, C. & Grebaut, P. (1990) Research on tsetse-fly traps (Diptera, Glossinidae) – development of an economic model, the Vavoua trap. *Tropical Medicine and Parasitology* 41, 185–192.
- Leclercq, M. (1971) Tabanidae (Diptera) des Basses-Alpes. *Bulletin des Recherches Agronomiques de Gembloux* 6, 424–431.
- Leclercq, M. (1977) Répartition en altitude des Tabanidae (Diptera) dans la province de Huesca (Pyrénées centrales espagnoles). *Publicaciones del Centro pirenaico de Biología Experimental* 8, 67–98.
- McCoy, E.D. (1990) The distribution of insects along elevational gradients. *Oikos* 58, 313–322.
- McElligott, P.E.K. & Galloway, T.D. (1991) Daily activity patterns of horse flies (Diptera, Tabanidae, *Hybomitra* spp.) in northern and southern Manitoba. *Canadian Entomologist* 123, 371–378.
- McElligott, P.E.K. & Lewis, D.J. (1998) Seasonal changes in abundance and gonotrophic age of host-seeking Tabanidae (Diptera) from a subarctic Labrador peatland. *Journal of Medical Entomology* 35, 763–770.
- Mihok, S. (2002) The development of a multipurpose trap (the Nzi) for tsetse and other biting flies. *Bulletin of Entomological Research* 92, 385–403.
- Mihok, S., Carlson, D.A., Krafusur, E.S. & Foil, L.D. (2006) Performance of the Nzi and other traps for biting flies in North America. *Bulletin of Entomological Research* 96, 387–397.
- Mullen, G.R. & Durden, L.A. (2002) *Medical and Veterinary Entomology*. Amsterdam, Academic Press.
- Mullens, B.A. & Gerhardt, R.R. (1980) Faunal composition and seasonal distribution of tabanids in three geographic regions of eastern Tennessee (Diptera, Tabanidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 82, 48–58.
- Okiwelu, S.N. (1977) Observations on resting sites of Tabanidae in a Miombo woodland in Republic of Zambia. *Journal of Medical Entomology* 14, 195–197.
- Oliveira, A.F., Ferreira, R.L.M. & Rafael, J.A. (2007) Seasonality and diurnal activity of Tabanidae (Diptera : Insecta) of canopy in the adolpho ducke forested reserve, Manaus, Amazonas State, Brazil. *Neotropical Entomology* 36, 790–797.
- Pyke, G.H., Inouye, D.W. & Thomson, J.D. (2011) Activity and abundance of bumble bees near Crested Butte, Colorado: diel, seasonal, and elevation effects. *Ecological Entomology* 36, 511–521.
- Raymond, H.L. & Rousseau, F. (1987) Abundance of horse flies (Diptera, Tabanidae) and reactions of cattle in a traditional farm of French-Guiana. *Acta Oecologica-Oecologia Applicata* 8, 125–134.
- Roux, C., Masson, D., Bricaud, O., Coste, C. & Poumarat, S. (2011) Flore et végétation des lichens et champignons lichénicoles de quatre réserves naturelles des Pyrénées-Orientales (France). *Bulletin de la Société Linneenne de Provence* 14, 3–151.
- Sheppard, C. & Wilson, B.H. (1976) Flight range of Tabanidae in a Louisiana bottomland hardwood forest. *Environmental Entomology* 5, 752–754.
- Sheppard, C. & Wilson, B.H. (1977) Relationship of horse fly host seeking activity to edge of wooded areas in southern Louisiana. *Environmental Entomology* 6, 781–782.
- ter Braak, J.F. & Smilauer, P. (2002) *Canoco Reference Manual and CanoDraw for Windows User's Guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5)*. Ithaca, NY, USA, Microcomputer power.
- Van Hennekeler, K., Jones, R.E., Skerratt, L.F., Fitzpatrick, L.A., Reid, S.A. & Bellis, G.A. (2008) A comparison of trapping methods for Tabanidae (Diptera) in North Queensland, Australia. *Medical and Veterinary Entomology* 22, 26–31.
- Van Hennekeler, K., Jones, R.E., Skerratt, L.F., Muzari, M.O. & Fitzpatrick, L.A. (2011) Meteorological effects on the daily activity patterns of tabanid biting flies in northern Queensland, Australia. *Medical and Veterinary Entomology* 25, 17–24.
- Wardhaugh, K. (2005) Insecticidal activity of synthetic pyrethroids, organophosphates, insect growth regulators, and other livestock parasitocides: an Australian perspective. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 789–796.

2.2. Activité de piqûre des taons et réactions de défense des hôtes

2.2.1. Activité de piqûre des taons

Le travail précédent visait à caractériser la distribution des différentes espèces dans l'ensemble de la matrice paysagère mais ne prenait pas en compte la présence éventuelle des hôtes. Or, il est vraisemblable que l'attraction exercée par les hôtes sur les femelles adultes soit suffisante pour que celles-ci s'affranchissent, au moins partiellement, du filtre paysager. L'étude de l'activité de piqûre des taons doit ainsi permettre d'évaluer l'exposition réelle des troupeaux, ce qui est essentiel pour améliorer les stratégies de protection (Muzari *et al.* 2010c). La caractérisation du comportement de piqûre peut également permettre d'optimiser l'utilisation des produits insecticides qui doivent pouvoir assurer une protection optimale des zones du corps les plus piquées (Mohamed-Ahmed & Mihok 2009).

Plusieurs études ont montré que les femelles *Tabanus* se posaient préférentiellement sur les pattes des bovins ou des chevaux (Raymond & Rousseau 1987; Phelps & Holloway 1990; Muzari *et al.* 2010c). Hribar *et al.* (1992) ont également dénombré davantage d'attaques sur la partie antérieure des vaches et le nombre de taons sur les pattes avant était fortement corrélé au nombre total observé sur tout le corps de l'animal.

Les taons attaquent aussi d'autres parties du corps et le choix des zones piquées est souvent dépendant de l'espèce (Mullens & Gerhardt 1979; Hollander & Wright 1980). Ainsi, les *Tabanus* de petite taille attaquent-ils surtout les pattes, les flancs ou le ventre alors que les *Tabanus* de grande taille se posent presque exclusivement sur le dos (Mohamed-Ahmed & Mihok 2009). Chez l'Homme, les *Tabanus* spp. préfèrent piquer les jambes tandis que *Haematopota pluvialis* et *Chrysops* spp. piquent plutôt à la tête et au cou (Chvála *et al.* 1972; Krčmar & Marić 2006).

La sélection des sites de piqûres reste encore mal expliquée. Elle dépend probablement de signaux physiques et chimiques comme :

- La forme du corps, la couleur et/ou la clarté de la lumière réfléchie (Blaho *et al.* 2012a) ;
- La différence de concentration en CO₂ entre les parties antérieure et postérieure de l'animal (Mullens & Gerhardt 1979) ;

- L'odeur du pelage (Magnarelli & Anderson 1980) ;
- La longueur de poils sur les différentes zones du corps (Mullens & Gerhardt 1979).

Les réactions de défense des animaux (notamment les coups de queue) et leur intensité pourraient aussi expliquer la sélection des sites de piqûre (Hribar *et al.* 1992). Enfin, une compétition interspécifique pour la ressource serait à l'origine de la partition du corps de l'animal mais cette hypothèse reste très contestée (Mohamed-Ahmed & Mihok 2009).

2.2.2. Réactions de défense des hôtes

Pour se prémunir des piqûres d'insectes, les ongulés utilisent différents comportements destinés à éviter, repousser ou déloger les insectes (Mooring *et al.* 2007). Ces comportements de défense peuvent être individuels ou collectifs. Ils comprennent les comportements de répulsion (coups de tête, coups de pattes, mouvements de queue, trémulations de la peau), les comportements d'évitement (déplacement vers une zone avec moins d'insectes) et les comportements de regroupement (bovins en groupe, chevaux tête-bêche). Les réactions de défense sont très efficaces pour repousser les insectes et diminuer les coûts associés aux attaques. Ainsi, le taux de gorgement des glossines est corrélé négativement à la fréquence des réactions de défense d'un bovin (Baylis 1996; Torr & Mangwiro 2000).

Concernant les Tabanidae, de telles réactions de défense ont été plusieurs fois observées. Raymond & Rousseau (1987) ont montré que les mouvements de queue d'un bovin étaient corrélés aux attaques de taons (Raymond & Rousseau 1987) tandis que Mohamed-Ahmed & Mihok (2009) ont trouvé une relation entre les coups de pattes et les piqûres de taons. Au Canada, les réactions de défense des bovins ont été enregistrées sur deux lots, l'un traité avec un insecticide (cyperméthrine) et l'autre non traité (Ralley *et al.* 1993). Le nombre de mouvements de queue et de coups de pattes étaient significativement plus élevés dans le groupe témoin.

Les comportements collectifs ont été moins étudiés alors qu'ils peuvent être très efficaces dans la prévention des piqûres en cas de fortes pullulations de taons. Aux Etats-Unis, il a été observé que des poneys réduisaient l'espace entre individus afin de diminuer l'intensité des attaques par

individu (Rutberg 1987). En France, des chevaux se déplaçaient en groupe vers une zone très exposée au vent où les taons étaient moins actifs (Hughes *et al.* 1981).

L'intensité des réactions de défense est variable d'un individu à l'autre. Elle dépend de la nuisance globale, de l'excitabilité de l'hôte et de son habitude à la douleur (Mullens *et al.* 2006). Les études sur les mouches piqueuses (taons, stomoxes et glossines) ont montré que :

- Des individus plutôt actifs sont moins piqués que des individus plutôt passifs (Raymond & Rousseau 1987) ;
- Des individus plus jeunes sont moins piqués par rapport aux adultes à cause de leur taille plus petite (ils sont moins attractifs) et de la fréquence élevée de leurs réactions de défense (Torr *et al.* 2001; Schofield & Torr 2002; Mohamed-Ahmed & Mihok 2009) ;
- Des individus peuvent s'habituer aux piqûres et moins se défendre au cours de la saison d'activité des mouches (Mullens *et al.* 2006).

2.2.3. Activité de piqûre des taons autour d'un troupeau de bovins en estive

Article 2 : Biting behaviour of Tabanidae on cattle in high-altitude summer pastures

F. Baldacchino, L. Puech, S. Manon, L. Hertzog & P. Jay-Robert.

Bulletin of Entomological Research, under review.

Résumé

L'objectif de ce travail était de mieux caractériser l'exposition réelle des troupeaux et le comportement de piqûre des taons en estive. Pour cela, nous avons suivi pendant six jours un troupeau de vaches allaitantes d'âge mixte et de race mixte d'une soixantaine d'individus. Chaque jour, nous avons observé dix vaches choisies aléatoirement sur trois périodes de la journée : matin (10h-11h), midi (12h30-13h30) et après-midi (15h-16h). Lors de chaque observation, nous avons noté le nombre d'attaques de taons et leur localisation sur le corps de l'animal, d'un seul côté pendant 1 min (Figure 8). En même temps, nous avons enregistré par vidéo les réactions de défense des bovins : coups de tête, coups de pattes et battements de queue. Parallèlement aux observations, deux pièges Nzi ont été installés à proximité du troupeau. Les pièges étaient relevés toutes les heures de 10h à 16h et déplacés en fonction de la position du troupeau (Figure 9).



Figure 8. Observations directes des attaques de taons et des réactions de défense des bovins (L. Puech, 2012)

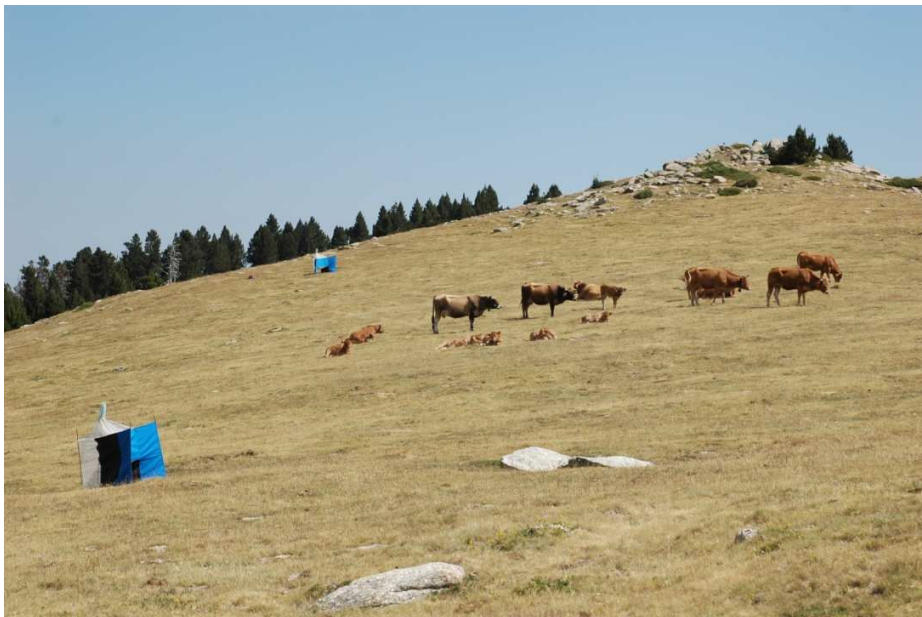


Figure 9. Pièges Nzi installés autour d'un troupeau de bovins (F. Baldacchino, 2012)

La position du troupeau était géoréférencée toutes les heures et les conditions météorologiques (température, humidité, vitesse du vent) étaient enregistrées à l'aide d'une station portable. La structure paysagère a été caractérisée autour des positions du troupeau (zone tampon de 200 m de diamètre) pour les habitats forestiers et ouverts comme dans l'article 1.

Les attaques de taons, variable réponse, ont été modélisées en fonction des différentes variables environnementales (paramètres climatiques, altitude et paramètres paysagers). Nous avons considéré les attaques de taons pour chaque tribu (Tabanini, Diachlorini et Haematopini) et dans leur globalité.

Plusieurs modèles linéaires généralisés mixtes (GLMM) ont été développés selon les bonnes pratiques de Bolker *et al.* (2009). La syntaxe du modèle sous R est selon l'exemple suivant :

```
lmer(formula=Tabanidae~Wind*Period+Temp*Period+Hum*Period+(Day|Id.vache)+(1|Position),  
family=poisson,data=att)
```

La variable réponse étant un décompte, nous avons utilisé une loi de poisson. Les variables environnementales et la période du jour ont été considérées comme les effets fixes des modèles. Les corrélations entre variables environnementales ont été testées avec le coefficient de corrélation de Pearson afin de ne pas inclure dans les modèles deux variables avec des coefficients de corrélation supérieures ou égales à 0,8. Nous avons considéré la position du troupeau à chaque période comme un effet aléatoire, noté « (1|Position) » dans le modèle. De même, le jour d'observation, noté « (Day|Id.vache) », représente une pseudo-réplication pour chaque vache, considérée comme un effet aléatoire continu.

Nous avons d'abord testés des modèles limités aux variables climatiques en interaction avec la période. Après avoir sélectionné les variables significatives, nous avons testé des modèles incluant l'altitude et des modèles incluant les effets paysagers. Les meilleurs modèles ont été sélectionnés en utilisant le critère d' Akaike (Akaike Information Criterion, AIC).

3921 taons (uniquement des femelles) appartenant à 15 espèces (Genres *Tabanus*, *Hybomitra*, *Atylotus*, *Philipomyia*, *Dasyrhamphis* et *Haematopota*) ont été collectés au cours des six jours d'étude. Les Tabanini représentaient la tribu la plus riche en espèces (11 espèces) et la plus abondante (65,3%) dans les pièges devant les Diachlorini (28,2%) et les Haematopini (6,5%).

Tabanus bromius et trois *Hybomitra* spp. (*H. montana*, *H. auripila* et *H. caucasica*) représentent 84% des Tabanini ; *P. aprica* et *H. pluvialis* constituent l'essentiel des collectes, respectivement, des Diachlorini (>99%) et des Haematopini (>95%).

Le nombre d'attaques moyen (\pm erreur standard) était de 4,3 (\pm 0,3)/vache/min. Les espèces les plus nuisibles pour les vaches appartenaient aux tribus Tabanini (49,2%), Diachlorini (28,1%) et Haematopini (22,7%). Exception faite des Haematopini, moins actifs le matin, l'intensité des attaques variait peu ou pas au cours de la journée.

Les pièges Nzi étaient peu efficaces pour la collecte des *Haematopota* spp. comme nous l'avions déjà suggéré dans l'article 1. Les collectes reflètent plutôt bien les attaques dues aux Tabanini et aux Diachlorini mais sous-estiment la nuisance occasionnée par les Haematopini. Pour *P. aprica*, on observe une corrélation positive significative entre les collectes journalières et le nombre quotidien moyen de piqûres observées par animal et par jour (Figure 10).

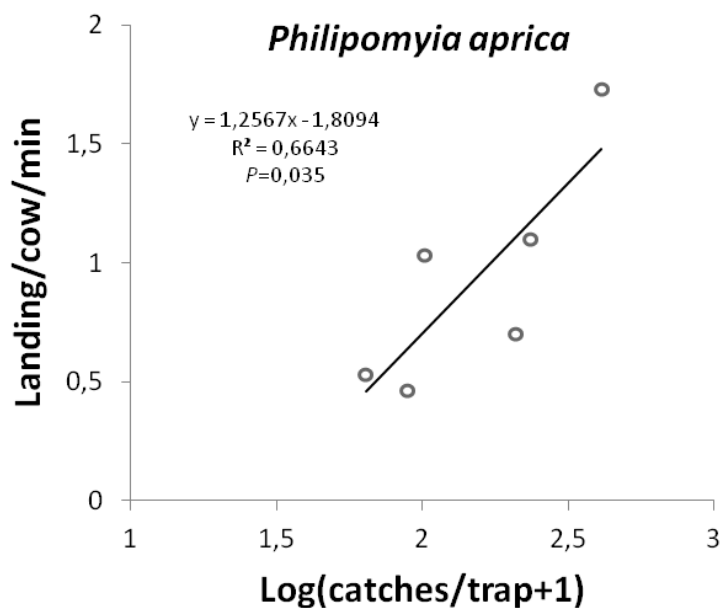


Figure 10. Régression linéaire simple : relation entre la moyenne quotidienne des attaques/vache/min et le logarithme des collectes/piège/jour pour *P. aprica*

La modélisation des attaques de taons (toutes tribus confondues) en fonction des paramètres climatiques montre que le nombre d'attaques est positivement lié aux températures du midi et de l'après-midi, et négativement lié à la vitesse du vent (le midi) et au taux d'humidité. Si on ajoute l'effet altitude au modèle, on observe une diminution des attaques avec l'élévation en altitude. Les attaques sont également plus faibles lorsque les températures matinales sont élevées, ce qui pourrait être une conséquence des courants thermiques rencontrés en montagne (Zardi & Whiteman 2012). Sur le Caucase, Chvála (1979) a observé que *Tabanus* sp. et *P. aprica* avaient un pic d'activité en fin d'après-midi et il suggéra que les courants thermiques étaient l'un des facteurs déterminants. En revanche, aucune association significative n'a été établie entre l'intensité des attaques et les paramètres paysagers.

Selon la tribu, les paramètres climatiques influencent différemment l'intensité des attaques. Pour les Tabanini, le nombre d'attaques est négativement corrélé au vent (le midi), au taux d'humidité, à la température (le matin) et à deux périodes de la journée (le midi et l'après-midi). Pour les Diachlorini, le nombre d'attaques est associé négativement à l'humidité (le midi) et à la vitesse du vent (le matin et le midi). Pour les Haematopini, le nombre d'attaques est négativement lié au vent, et positivement lié à la température et à la période (le midi).

L'activité des taons est donc étroitement liée aux conditions climatiques. L'influence de l'altitude est probablement due aux relations qui existent entre altitude et variables météorologiques. Plus généralement, la température et la vitesse du vent expliquent les variations de densités et la vitesse de déplacement chez les insectes (Bell *et al.* 2013). Chez les taons, des températures basses semblent limiter l'initiation du vol (Amano 1985) tandis qu'un vent fort inhibe le vol et perturbe les signaux olfactifs présents dans l'air (Gibson & Torr 1999).

Nous avons ainsi démontré un effet positif de la température et un effet négatif du vent sur l'activité des *Haematopota* sp. Ce sont des espèces petites qui sont certainement très sensibles aux fluctuations thermiques et à la vitesse du vent. Les espèces plus grandes (*Tabanus* sp., *Hybomitra* sp. et *P. aprica*) sont, elles, davantage influencées par la vitesse du vent et l'humidité qui ont un effet négatif sur leur activité de piqûre. L'humidité est généralement associée à une baisse des températures, plutôt défavorable à l'activité des taons.

Grâce à l'observation directe des attaques, nous avons également identifié les sites préférentiels de piqûre sur le corps des vaches en fonction des tribus. Les Tabanini et les Diachlorini attaquent préférentiellement les pattes avant (55,8% et 53,9%), les pattes arrière (19,2% et 8,6%) et la mamelle (16,8% et 31,7%). Les Haematopini attaquent surtout les pattes arrière (48,4%) et le flanc (24,7%). Les *Haematopota* sp. étaient les seuls à piquer au cou et à la tête tandis que *T. sudeticus* (facilement identifiable grâce à sa très grande taille) était la seule espèce à piquer sur le dos.

Le décompte des réactions de défense montre que les coups de pattes ($r^2 = 0,181$; $P < 0,001$) et les coups de queue ($r^2 = 0,115$; $P < 0,001$) sont corrélés positivement avec le nombre d'attaques (Figure 11). L'observation des coups de pattes, notamment, pourrait donc permettre d'évaluer la nuisance sans avoir à dénombrer précisément les attaques.

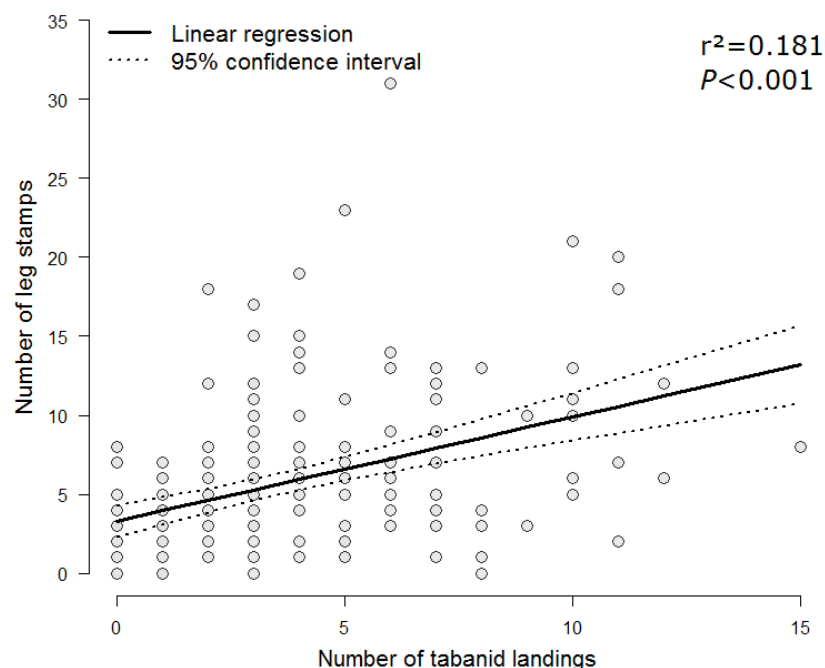


Figure 11. Régression linéaire simple : relation entre le nombre de piqûres de taons et le nombre de coups de pattes

Article 2 : Biting behaviour of Tabanidae on cattle in mountainous summer pastures

F. Baldacchino, L. Puech, S. Manon, L. Hertzog & P. Jay-Robert.

Bulletin of Entomological Research, under review.

Biting behaviour of Tabanidae on cattle in mountainous summer pastures

F. Baldacchino, L. Puech, S. Manon, L. Hertzog and P. Jay-Robert
UMR 5175, Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive (CEFE), Université Paul-Valéry (UM3), 34199 Montpellier Cedex 5, France

Abstract

During the summer, cattle in mountainous pastures can be highly exposed to tabanid bites. The persistent biting behaviour of tabanids not only causes disturbance, but is also responsible for transmitting diseases such as bovine besnoitiosis. The purpose of this study was to better identify the level of tabanid annoyance on cattle by means of collection (using insect traps) and direct observation of cows. Tabanids were active during the entire daily observation period (10:00–16:00), except for *Haematopota* sp., which were less active in the morning. The tabanids collected in Nzi traps were generally representative of those that landed on cattle, except for *Haematopota* sp., as Nzi traps were not very effective for these species. The preferred feeding sites for most species appeared to be a cow's legs or udder, and leg stamping was the defensive reaction most related to a tabanid alighting on a host. Generalized linear mixed models showed that the parameters associated with tabanid landings on hosts were related to weather and altitude, but not to landscape structure. Increased landings were mostly associated with the higher temperatures and lower wind speeds at midday, but some differences were observed between species. The results indicate that cattle-protection measures should be taken during the peak of tabanid abundance when climatic conditions favour intense biting activity. Nzi traps set close to livestock were very effective for collecting tabanids and could help in reducing the annoyance caused by horse flies.

Keywords

Tabanidae, biting behaviour, cattle, pastures, defensive behaviour, horse flies

Introduction

Biting insects impose a number of costs on ungulate hosts, including blood loss, decreased feeding and resting time caused by disturbance, and disease transmission (Mooring et al., 2007). Tabanids are free-living adult haematophagous flies that are major livestock pests due to their painful and persistent biting behaviour (Foil and Hogsette, 1994; Mullen and Durden, 2002). One study in southern Louisiana (USA) recorded landing rates on horses of up to 1,000 tabanids per hour (Foil and Foil, 1988). Moreover, tabanids are mechanical vectors of agents of animal disease, such as bovine besnoitiosis and equine infectious anaemia (Bigalke, 1968; Foil and Issel, 1991; Foil et al., 1983), which are considered emerging diseases in Europe (Alvarez-García et al., 2013; Hans et al., 2012).

Cattle are highly exposed to tabanids in summer pastures where larval habitats are independent of domestic livestock because wild animal blood sources are also available to maintain annual tabanid populations (Foil and Hogsette, 1994). Bovine besnoitiosis is enzootic to the Pyrenees Mountains, and cattle pasturing in valleys there may have been the origin of the spread of the disease to neighbouring regions (Jacquiet et al., 2010). However, the biting behaviour of tabanids on cattle is poorly known in such mountainous areas. A better understanding of the alighting and feeding behaviour of tabanids on vertebrate hosts could lead to better intervention strategies and improved disease management (Muzari et al., 2010). For example, documenting alighting sites allows a more economical use of residual insecticides on hosts (Mohamed-Ahmed and Mihok, 2009). Although many observations have been conducted on various tabanid hosts, especially ungulates, in different parts of the world, most have been in plains (Barros and Foil, 2007; Hollander and Wright, 1980; Lewis and Leprince, 1981; Mohamed-Ahmed and Mihok, 2009; Mullens and Gerhardt, 1979; Muzari et al., 2010; Phelps and Holloway, 1990; Raymond and Rousseau, 1987). Previous studies have not been made on tabanid species in high-altitude summer pastures.

To reduce the pain, blood loss and other negative impacts of insect bites, ungulates use a varied arsenal of behaviours to repel or dislodge biting insects (Mooring et al., 2007). Defensive reactions against biting flies include insect-repelling behaviour (e.g. tail flicking, leg stamping), evasive behaviour (e.g. moving to an area such as a forest or windy hilltop with less parasite activity), and herding behaviour (gathering into groups to lessen parasite intensity per animal) (Hart, 1992; Mullens et al., 2006). Defensive reactions are effective in removing flies and reducing the impact of insect bites (Mooring et al., 2007); indeed, the rate of insect-repelling behaviour is negatively correlated with the feeding success of biting flies (Baylis, 1996; Torr and Mangwiro, 2000). Defensive behaviour to avoid tabanids has been observed in horses, moving together to an area usually exposed to the prevailing wind (Hughes et al., 1981), as well as in individual cattle responses, including head throwing, leg stamping and tail flicking (Ralley et al., 1993; Raymond and Rousseau, 1987). These defensive reactions may play a major role in protecting cattle from tabanid bites, particularly in summer pastures, and the frequency of such reactions could perhaps be used as an index of tabanid abundance for herders.

As with other biting insects, the annoyance level of tabanids to livestock is closely related to the flies' abundance in the field; large numbers of bites can directly reduce weight gain, milk yield and feeding efficiency in cattle, and can hide potential injury caused by the bites (Mullen and Durden, 2002; Perich et al., 1986). Moreover, the intensity of contact between hosts and vectors is key to the mechanical transmission of pathogens, as highlighted by a mathematical model developed by Desquesnes et al. (2009). In a previous study of Pyrenean summer pastures, tabanid abundance appeared to be influenced by altitude and landscape structure (Baldacchino et al., 2013c). Maximum abundance was observed between the end of June and the beginning of August, and the main species showed a peak of activity at midday. Several other studies have also shown the abundance and daily activity of tabanids to be related to landscape parameters

(altitude, vegetation and presence of water bodies) or climatic conditions (temperature, humidity and wind) (Chvála et al., 1972; Hackenberger et al., 2009; Sheppard and Wilson, 1977; Van Hennekeler et al., 2011). However, these findings were all based on field experiments using trapping. Although in most population surveys efficient traps are assumed to adequately reflect the actual abundance of flies, this approach generally requires comparisons with other sampling methods, such as direct counts of tabanids on cattle (Gilles et al., 2007; Thomas et al., 1989). Therefore, our study aimed to estimate the annoyance level of tabanids on cattle through entomological observations, and to test the influence of environmental variables on tabanids' biting behaviour.

To identify tabanid annoyance of cattle in summer pastures, a herd of cattle was followed for six days in the French eastern Pyrenees. Entomological and behavioural observations were conducted in parallel with collection by trapping. Our objectives were (i) to observe the selection of feeding sites by tabanids depending on tribe, (ii) to study the cattle host's defensive reactions, (iii) to determine if tabanids collected in traps correspond to direct counts of landings on cows during the day, and (iv) to assess the influence of meteorological conditions, altitude and landscape structure on tabanids alighting on cattle.

Materials and methods

Study site and cattle

The summer pasture where the study took place is located in a valley of the Mantet Nature Reserve (French eastern Pyrenees) on the northwest slope of the Costabona massif (2°18' E 42°28' N), at an altitude ranging from 1450 to 2700 m a.s.l. The climate is influenced both by moderate Atlantic conditions and orogenic continental conditions. It has a mean annual temperature of 9.5 °C and an annual rainfall of 855 mm (mean for Mantet village, 1545 m a.s.l.) (Mantet Nature Reserve data, unpublished). The geology of the area includes primarily metamorphic rocks from the Mantet-Fillos rift. The landscape is a complex mosaic of woodlands (primarily *Pinus uncinata* and *Betula* spp.), moorland (primarily *Cytisus oromediterraneus*), rocks, pastures and grasslands. Wetlands and aquatic habitats are poorly represented.

A total of 180 cows were present in the valley during the study period (in the summer of 2012). The study was conducted on a mixed-age and mixed-breed (Limousine and Aubrac) herd of 68 individuals. This herd was followed for six days (17, 18, 19, 20, 25 and 26 July) between 10:00 and 16:00. Its position was georeferenced every hour using a GPS TwoNav Sportiva (CompGPS Team SL, Barcelona, Spain). In addition, the temperature, relative humidity (RH) and wind speed were measured using a Kestrel 4500 pocket weather tracker (KestrelMeters.com, Birmingham, MI, USA). This meteorological data was recorded every 30 minutes (Table 1).

Mapping

For the three periods of each study day (morning, noon and afternoon), a circle with a 200-m radius was overlaid on the herd position. Within each circle, polygon-shaped patches of

homogeneous habitat were delineated according to the vegetation cover using aerial orthophotography dating from 2009 and classified into two land-cover classes, forested and unforested, using ArcMap 9.3 (ESRI Inc., California, USA) as in Baldacchino et al. (2013c). Forested patches (F) corresponded to conifer forests, and unforested (UF) patches corresponded to open areas such as grasslands, pastures, moors, bushes, rocky areas, water or mixed vegetation. Landscape metrics were calculated in each circle using the patch analyst extension for ArcGis 9.x. Forested and unforested patches were characterized by mean patch size (MPS, ha) and mean perimeter–area ratio (MPAR, m/ha) as an indicator of the patch-shape complexity (Table 1).

Tabanid landings and host defensive behaviour

The study was conducted during over six days, and counts were carried out three times a day: morning (10:00–11:00), noon (12:30–13:30) and afternoon (15:00–16:00). For each time period, ten adult cows were chosen randomly in the herd and tabanid landings and host defensive reactions were counted on one side of the cow during one minute.

Tabanid landings were estimated by counting each tabanid that landed on the visible side of the cow's body. To report the alighting sites on the cow, its body was divided into seven parts (head and neck, back, flank, belly, udder, forelegs and hind legs). Observations were made from a distance of about 3–5 m, using binoculars as needed. In these circumstances, female tabanids could not be easily identified to genus, and even less to species, level. As a consequence, they were allocated to tribe (Tabanini, Diachlorini or Haematopini) to avoid identification mistakes. One observer did all the counting over the six days.

In parallel, cow behaviour was recorded using a DCR–SR21E Digital Video Camera Recorder (Sony, Tokyo, Japan). Three insect-repelling behaviours were selected as in Mullens et al. (2006): tail flicking, leg stamping and head throwing.

Trapping

On the study days, two Nzi traps (Mihok, 2002) were set near the cattle between 10:00 and 16:00. The traps were made from blue and black components (SuperMaine 300 g cotton/polyester 65/35, TDV industries, France) and polyester mosquito netting. Aged cow urine (50 ml) was used as an attractant and placed under each trap in plastic vials with a 2.5-cm aperture. The traps were collected every hour and moved as necessary according to the movements of the cattle. The tabanids were identified using Chvála's key (1972).

Statistical analysis

For each tribe, the correlation between the daily catches of tabanids per trap and the daily mean landings per cow and per minute was tested using the Spearman's rank-order correlation coefficient.

The Kruskal-Wallis test and Bonferroni-corrected Mann-Whitney pairwise comparisons were used to test the effect of the period (morning, noon and afternoon) on tabanid landings as well as to compare landings on the different parts of a cow's body.

To describe the relationships between the host's defensive reactions (head throwing, leg stamping and tail flicking) and tabanid landings, linear regressions were conducted.

The effects of meteorological parameters (wind, temperature and humidity), altitude and landscape parameters (MPSF, MPSUF, MPARF and MPARUF: see acronym definitions in Table 1) on tabanid landings were assessed using generalized linear mixed models (GLMM). GLMM were developed for tabanid landings according to the 'best-practice' data analysis of Bolker et al. (2009). Because the response variable (landings per cow per minute) was count data, we used a Poisson model (log link). The mean number of landings per cow within a day or a period of the day was sometimes <5 , so we fitted the GLMM using Laplace approximation. The position of the cattle at each observation period was considered a random effect. A day of observations represented pseudoreplication for each cow and was set as a continuous random effect in the model (Crawley, 2007; Zuur et al., 2009).

Meteorological data, altitude, landscape variables and period of the day were fixed effects. All environmental variables were standardized before modelling, and correlations between the variables were tested using Pearson's correlation test (Fig. 1). Altitude was highly correlated with MPSUF and MPARUF; MPSUF was highly correlated with MPSF and MPARUF (Pearson's coefficient $r > 0.7$). The function `lmer` in the package `lme4` from R was used to compute the GLMM (Bates et al., 2012). Different models were built with the variable response defined as landings of all tabanids, landings of Tabanini, landings of Diachlorini or landings of Haematopini: (i) models with the interaction of meteorological data and the period of the day, (ii) models with altitude in addition to the fitted models with the meteorological data, (iii) and models with landscape parameters (except MPSUF) in addition to the fitted models with the meteorological data. The overdispersion of the models was estimated using the function `overdisp_fun` in R. The models were compared using the Akaike Information Criterion (AIC). All statistical analyses were performed using R (Team, 2013).

Results

Tabanid trapping and landings

The field experiments (trapping and observations) were carried out during sunny days. A total of 3,921 tabanids (all females) belonging to 15 species in 6 genera (*Tabanus*, *Hybomitra*, *Atylotus*, *Philipomyia*, *Dasyrhamphis* and *Haematopota*) were collected over the study period (Table 2). Tabanini was the most abundant tribe caught (65.3%) and the richest in species (11). The four main species were *T. bromius* and *Hybomitra* sp. (*H. montana*, *H. auripila* and *H. caucasica*), representing 84% of the Tabanini caught. Diachlorini represented 28.2% of the catches, whereas Haematopini represented only 6.5% of the catches. Diachlorini and Haematopini were both

dominated by one species, *Philipomyia aprica* and *Haematopota pluvialis*, respectively. Therefore, for these two tribes, tribe results can be interpreted as species results.

The mean (\pm SE) landing count was 4.3 ± 0.3 per cow per minute, 49.2% of which were Tabanini, 28.1% Diachlorini and 22.7% Haematopini. For Diachlorini (*P. aprica*), the catches per trap were highly correlated with the landings ($r_s=0.88$, $P<0.05$), unlike Tabanini ($r_s=0.20$, $P=0.44$) and Haematopini ($r_s=0.30$, $P=0.54$). Landing counts and trap catches for each day are illustrated for each tribe in Fig. 2. There were no significant differences in landings according to the period of the day except for Haematopini ($H_c = 17.95$, $p < 0.001$).

Alighting sites and host defensive reactions

Observations showed that Tabanini and Diachlorini landed preferentially on the forelegs (55.8% and 53.9%, respectively), the hind legs (19.2% and 8.6%, respectively) and the udder (16.8% and 31.7%, respectively) (Fig. 3). In contrast, Haematopini were observed frequently on the hind legs (48.4%) and the flank (24.7%). *Haematopota* spp. were the only species that fed on the head (including the neck), and *Tabanus sudeticus*, the largest species observed (distinctly identified because of its size), was the only species that landed on the back. Overall, observations indicated that a cow is most frequently bitten by tabanids on the legs (67%) and the udder (20%).

In parallel with tabanid landings, host defensive reactions were counted on one side of a cow during one minute (Fig. 4). Linear regressions were conducted to describe the relationships between defensive reactions and tabanid landings. The r^2 values were highly significant ($P < 0.001$) for leg stamping ($r^2 = 0.181$) and tail flicking ($r^2 = 0.115$), but not significant for head throwing ($r^2 = 0.009$, $P=0.113$).

Modelling tabanid landings in relation to environment variables

First, we modelled the landing of all tabanids (without distinguishing between the tribes) depending on meteorological data, including altitude or landscape parameters as variables or not. The model that included the interaction of meteorological data and the period of the day showed that increased tabanid landings were significantly associated with higher temperatures at noon and in the afternoon, lower wind speed at noon and lower humidity during the day (Table 3a). The model that included altitude showed that higher altitude caused a significant decrease in tabanid landings, as did higher temperatures in the morning (Table 3b). These two models were slightly overdispersed with a ratio equal to 1.20 and 1.25, respectively, and their AIC values were extremely close (415.5 and 413.8, respectively). The model that included landscape parameters showed no significant effect of size or shape complexity of forested and/or unforested patches on tabanid landings.

Next we modelled the landings of each tribe; we observed different results according to the tribe. For Tabanini, landings were negatively associated with wind speed at noon, relative humidity, morning temperature and two periods of the day: noon and afternoon (Table 3c). For Diachlorini,

landings were negatively associated with humidity at noon and wind speed in the morning and at noon (Table 3d). For *Haematopini*, landings were negatively associated with wind speed, and positively correlated with temperature and the period of the day at noon (Table 3e). Models that differentiated landings by tribe did not show any association with altitude or landscape parameters.

Discussion

Tabanid trapping and landings

In a 2011 study, a total of 1,289 tabanids, belonging to 13 species, were collected at the same study site, using nine Nzi traps and nine Vavoua traps set along an elevation gradient during eight 48-hour sessions (Baldacchino et al., 2013c). In the 2012 study discussed in this paper, we collected three times as many tabanids, belonging to 15 species, with only two Nzi traps set close to a herd of cattle during six days. In the vast mountainous summer pastures, a herd of cattle appeared to be very attractive for horse flies, which use visual and olfactory cues to locate a host (Gibson and Torr, 1999; Horváth et al., 2010). Our experiment's trapping design showed that visually attractive, baited traps can be very effective at catching tabanids in the vicinity of a herd. Setting more than two traps might even help to decrease tabanid populations. In Louisiana, horse fly populations on cattle were reduced by setting sticky traps baited with dry ice around a pasture where the animals were confined (Wilson, 1968). Yet no such practical experiment has been conducted since the 1970s despite the fact that trap attractiveness for tabanids has been improved by coloured fabrics and odorant baits (Mihok, 2002; Mihok and Mulye, 2010).

The proportions of the main collected species in 2012 (and 2011) were: 43% (51% in 2011) *P. aprica*; 39% (16% in 2011) *T. bromius*; 24% (16% in 2011) *Hybomitra* sp. (*H. montana*, *H. auripila* and *H. caucasica*); and 9% (0.5% in 2011) *Haematopota pluvialis* (Baldacchino et al., 2013c). Assuming that the composition of the tabanid population was similar between 2011 and 2012, it appears that *Haematopota* sp., *Tabanus* sp. and *Hybomitra* sp. were caught more when traps were set in the vicinity of a herd, while *P. aprica* was caught more when traps were set in the valley without considering the position of the herd. This suggests that, in summer pastures, *Haematopota* sp., *Tabanus* sp. and *Hybomitra* sp. feed mostly on cattle, whereas *P. aprica* is less attracted by cattle. These findings are consistent with identifications of blood meals using PCR-assays conducted on specimens collected in 2011. *T. bromius* was found to feed mainly on cattle and *P. aprica* was found to feed mainly on red deer (Baldacchino, under review).

Comparisons between trapping and landings show that for Tabanini and Diachlorini, catches adequately correlate to the intensity of landings, but catches of *Haematopini* underestimated the number of landings (22.7% of the total landings vs. 6.5% of the total catches). This result is not surprising, as in 2011, Nzi traps appeared to be less effective for *Haematopota* sp. (Baldacchino et al., 2013c). Nonetheless, Nzi traps should be tested as a useful means of reducing tabanid biting of cattle because the majority of the annoyance is caused by Tabanini and Diachlorini.

Daily biting activity and the influence of environmental variables

Cows were bitten by tabanids from 10:00 to 16:00 with no difference in the period of the day, apart from Haematopini species, which were significantly less active in the morning.

Haematopota pluvialis has been described as a species that is very active from midday to afternoon, but also in the evening; its main peak of daily activity was recorded as between 12:00 and 15:00 in a study in southern Bulgaria (Chvála et al., 1972). In a study in the Pyrenees, a 1-day collection (carried out between 7:00 and 19:00) revealed that 50% of the total specimens of *H. pluvialis* ($N=15$) were caught between 13:00 and 17:00 (Baldacchino, unpublished data). Yet although tabanids were observed to be most abundant between 11:00 and 13:00 in the Pyrenees, landing counts show that Tabanini and Diachlorini species were equally annoying for cattle between 10:00 and 16:00. In fact, in 2011, some species, such as *P. aprica* and *H. auripila*, were also collected in relatively high proportions (over 20% of the daily catches) between 9:00 and 11:00, and between 13:00 and 15:00 (Baldacchino et al., 2013c).

Meteorological parameters appeared to have a great influence on tabanid biting behaviour, especially in conjunction with the period of the day. In our models, wind speed and the temperature at noon were closely associated with the number of landings (Tables 3a and 3b). This is consistent with other studies that show the peak activity of tabanids at midday in the Pyrenees (Baldacchino et al., 2013c). Tabanids are haematophagous Diptera that are mostly diurnal, and their daily activity patterns have been observed to be related to climatic conditions such as wind velocity, temperature, relative humidity (RH), evaporation, atmospheric pressure and sky radiation or cloud cover (Alverson and Noblet, 1977; Burnett and Hays, 1974; Dale and Axtell, 1975; Van Hennekeler et al., 2011). In a study in southeastern France, daily catches of *Tabanus bromius* and *Atylotus quadrifarius* appeared to be positively correlated with temperature and/or negatively correlated with wind speed (Baldacchino et al., 2013a; Baldacchino et al., 2013b), as in our observations in the Pyrenees. More generally, temperature and wind speed have been shown through GLMM analysis to drive variation in the daytime aerial density and displacement speed of insects (Bell et al., 2013). The relationship was positive for temperature and negative for wind speed. Low temperatures seem to limit the initiation of flight activity (Amano, 1985), while high wind velocity inhibits flight activity, particularly when the wind exceeds the insect's maximum air speed. It also affects the airborne olfactory cues available to insects (Gibson and Torr, 1999).

Surprisingly, tabanid landings were also negatively associated with morning temperatures in the model that included altitude (Table 3b). This is likely to be explained by diurnal mountain winds, also known as thermally driven winds (Zardi and Whiteman, 2012). In the morning, winds flow upwards as the atmosphere warms up after sunrise. So the negative effect of temperature on tabanid landings in some circumstances may be explained by the influence of thermal mountain winds. Chvála (1979) suggested that these winds were a decisive factor alongside temperature and relative humidity in explaining the daily activity of *Tabanus* sp. and *P. aprica* in the Caucasus.

Van Hennekeler et al. (2011) also found that different species of horse fly respond differently to weather variables throughout the day. In our study, we observed that tabanids of different tribes respond differently to weather variables (Tables 3c, 3d and 3e). Wind speed and relative humidity appeared to be the decisive factors for medium-sized and large species (Tabanini and Diachlorini), whereas temperature appeared to be the decisive factor for smaller species (Haematopini). The period of the day was also associated with landing frequency. For Haematopini, landings increased at noon; this finding is consistent with the previously described daily activity of *Haematopota* sp. (Fig. 2). For Tabanini, noon and afternoon were negatively associated with landings, corresponding to a decrease in *Tabanus* sp. and *Hybomitra* sp. collections during the day (Fig. 2).

Altitude had an impact on the number of tabanid landings on cattle. Körner (2007) distinguished two categories of environmental changes associated with altitude: altitude-specific conditions (e.g. atmospheric pressure, temperature, clear-sky turbidity, etc.) and non-altitude-specific conditions (e.g. moisture, hours of sunshine, wind, geology, etc.). In 2011, the abundance of *T. bromius* and *P. aprica* was found to be negatively related to altitude. In 2012, as in 2011, they were the two most abundant species. Therefore, it is consistent to observe a negative effect of altitude on tabanid landings, and this effect can be explained by the influence of altitude on weather variables. In mountainous regions, weather variables are also influenced by the orientation of the slope. In a study in Croatia, the determining variables for tabanid distribution on the southern slope (a Mediterranean climatic zone) were temperature and wind, and on the northern slope (a continental climatic zone), humidity (Hackenberger et al., 2009).

In terms of landscape structure, tabanid landings were not influenced by this variable in this study, although in previous studies tabanids have been observed to be very active at the edges of woods (Sheppard and Wilson, 1977), and, at the same study site, species richness and insect abundance have been found to be negatively correlated with large open habitats and positively correlated with patch-shape complexity (Baldacchino et al., 2013c). It appears that the cattle herd is very attractive whatever its position in the pasture. Moreover, the great dispersal capacity of tabanids allows them to fly over 1 km a day to find a host, so whatever their preferred landscape, they can alight on hosts wherever they are within that range (Cooksey and Wright, 1987; Konstantinov, 1993; Sheppard and Wilson, 1976).

Feeding site selection and host defensive reactions

The selection of particular body regions of a host by tabanids has been observed to be species-specific; several explanations for this are possible. (i) Visual cues play an important role in host location for female tabanids, which are diurnal blood feeders. One study has shown that the degree of light polarization on a host elicited polarotaxis in female tabanids and that the horizontally polarizing parts of a host's body (neck, back and hindquarters) may be the most attractive from a distance (Blahó et al., 2012; Horváth et al., 2010). However, the alighting sites

of tabanids on models of horses were distributed randomly across the whole body surface, and other visual cues (e.g. brightness and colour of reflected light, shape of the host's body) might also be used to select a feeding site. (ii) Concerning chemical cues, differences in carbon dioxide concentration between the anterior and posterior of an animal have been suggested to explain the preference of tabanids for the anterior region (Mullens and Gerhardt, 1979). Octenol, a component of ruminant breath, could also be involved, as it has been proven to be a good attractant (Baldacchino et al., 2013b). However, although the long-range olfactory response of tabanids to host odours has been well documented in locating a host, its implication in choosing a final alighting site remains poorly known (Gibson and Torr, 1999). (iii) Host defensive reactions, particularly tail flicking, could also explain why tabanids are less present on the posterior region (Hribar et al., 1992). A swishing tail is effective at repelling flies over a broad area of the body surface. Larger bovids were found to have longer tails, probably because they tend to attract more biting flies (Mooring et al., 2007). (iv) The mean hair length on different parts of a host's body is also likely to be a factor in tabanid selection of a landing site, as it is positively correlated with the length of a tabanid's mouthparts (Mullens and Gerhardt, 1979). (v) Finally, inter-specific competition could have led to partitioning of flies on the host, but this hypothesis is quite controversial because resources such as blood and space do not seem to be limiting factors (Mohamed-Ahmed and Mihok, 2009).

In Pyrenean summer pastures, cows' legs and udders appeared to be tabanids' preferred feeding sites. Similar observations have been made on ungulates in other parts of the world. In Guyana, *Tabanus* spp. landed most often on the legs of a cow (>90%) (Raymond and Rousseau, 1987). In Queensland (Australia), *Tabanus* spp. most often preferred landing on the legs of a horse (70–100%) (Muzari et al., 2010). In Louisiana (USA), tabanids fed preferentially on the anterior of a cow, and the number of tabanids on the front legs was a reflection of the overall annoyance for the cow (Hribar et al., 1992). In comparison, the lower legs of a human were the preferred feeding sites for *Tabanus* spp. and *Philipomyia graeca*, whereas *Haematopota pluvialis* preferred the head and neck (Krčmar and Marić, 2006). In our study, *Haematopota* sp. were the only species that fed on the head and neck of cows, while *Tabanus sudeticus* was the only species that fed on a cow's back. Studies of horse flies in the USA show that the smallest *Tabanus* spp. most often land on the legs, flanks or lower body, whereas large *Tabanus* spp. land almost exclusively on the back (Mohamed-Ahmed and Mihok, 2009). As tabanids appear to favour certain alighting sites, chemical treatments topically applied to the animal must be effective on these body regions. This behaviour should be assessed by pharmaceutical companies and taken into account when developing products used as sprays.

Of the three host defensive movements observed, leg stamping is the most common response to tabanid landings. Several authors have made similar observations concerning defensive reactions of cattle against horse flies. In Sudan, a significant correlation was found between a cow's leg stamping and alighting frequency of tabanids (Mohamed-Ahmed and Mihok, 2009). In Canada, horse flies increased individual avoidance responses of cattle, and the amount of tail switching

and leg stamping was significantly higher in a control herd compared to a herd treated with insecticide (cypermethrin) (Ralley et al., 1993). In Guyana, tail flicking seemed to be proportionate to the number of horse flies on a cow (Raymond and Rousseau, 1987). However, although tail flicking and leg stamping are well correlated with tabanid landings, the relationship is not as close as might be expected. Indeed, host defensive reactions also depend on other flies, the excitability of the host, and its habituation to pain (Mullens et al., 2006; Raymond and Rousseau, 1987; Warnes and Finlayson, 1987). Excitability and habituation effects have been demonstrated in studies of behavioural responses of cattle to stable flies. Individuals that respond vigorously suffer less from insect bites than more placid individuals (Warnes and Finlayson, 1987). In contrast, habituation to the pain associated with fly biting results in decreased defensive reactions over time (Mullens et al., 2006). Nonetheless, practically speaking, monitoring defensive reactions may be easier than monitoring tabanid landings, so in this way counting leg stamps could prove a useful tool for assessing the intensity of tabanid biting of cattle. This method could help in evaluating the annoyance they cause as well as testing the effectiveness of treatments.

Conclusion

The results of our study indicate that in high-altitude summer pastures, landscape structure is not associated with the biting activity of tabanids, although their distribution has been observed to be influenced by landscape variables in relation to breeding sites, host-seeking areas and resting sites (Baldacchino et al., 2013c). This is likely to be explained by the high attractiveness of the herd and the great dispersal capacity of tabanids. On the other hand, their biting activity was strongly associated with weather variables, and altitude was also a factor in terms of how it affects the climate. It seems that it is difficult for animals to avoid the biting of tabanids during summer days, although host defensive reactions are quite effective at dislodging females and limiting their blood-feeding success. Our results suggest that an integrated pest management strategy should implement protective measures for livestock during the peak of horse fly abundance, in July and August, when the days are very hot and dry and there is little wind. Nzi traps set close to livestock were very effective in catching tabanids. Further investigation of the practical use of visually attractive traps such as these is possible for reducing tabanid bites on cattle in pastures.

Acknowledgements

We would like to thank Claude Guisset of the Mantet Nature Reserve for his invaluable help in the field. We are also grateful to Aurélien Besnard (CEFE), Sophie Padie (CEFE), Sophie Monsarrat (CEFE) and Thomas Balenghien (CIRAD) for their useful contributions to the manuscript.

References

- Alvarez-García, G., Frey, C.F., Mora, L.M., Schares, G., 2013. A century of bovine besnoitiosis: an unknown disease re-emerging in Europe. *Trends Parasitol* doi: 10.1016/j.pt.2013.06.002.
- Alverson, D.R., Noblet, R., 1977. Activity of female Tabanidae (Diptera) in relation to selected meteorological factors in South Carolina. *Journal of Medical Entomology* 14, 197-200.
- Amano, K., 1985. Statistical analyses of the influence of meteorological factors on flight activity of female tabanids. *Kontyû, Tokyo* 53, 161-172.
- Baldacchino, F., Carier, J., Porciani, A., Buatois, B., Dormont, L., Jay-Robert, P., 2013a. Behavioural and electrophysiological responses of females of two species of tabanid to volatiles in urine of different mammals. *Medical and Veterinary Entomology* 27, 77-85.
- Baldacchino, F., Manon, S., Puech, L., Buatois, B., Dormont, L., Jay-Robert, P., 2013b. Olfactory and behavioural responses of tabanids to octenol, phenols and aged horse urine. *Medical and Veterinary Entomology* in press.
- Baldacchino, F., Porciani, A., Bernard, C., Jay-Robert, P., 2013c. Spatial and temporal distribution of Tabanidae in the Pyrenees Mountains: influence of altitude and landscape structure. *Bulletin of Entomological Research* in press.
- Barros, A.T.M., Foil, L.D., 2007. The influence of distance on movement of tabanids (Diptera : Tabanidae) between horses. *Veterinary Parasitology* 144, 380-384.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B. 2012. lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and Eigenfaces. *Journal of Statistical Software* 65, 1-68.
- Baylis, M., 1996. Effect of defensive behaviour by cattle on the feeding success and nutritional state of the tsetse fly, *Glossina pallidipes* (Diptera: Glossinidae). *Bulletin of Entomological Research* 86, 329-336.
- Bell, J.R., Aralimarad, P., Lim, K.-S., Chapman, J.W., 2013. Predicting Insect Migration Density and Speed in the Daytime Convective Boundary Layer. *Plos One* 8.
- Bigalke, R.D., 1968. New concepts on the epidemiological features of bovine besnoitiosis as determined by laboratory and field investigations. *The Onderstepoort journal of veterinary research* 35, 3-137.
- Blahó, M., Egri, A., Barta, A., Antoni, G., Kriska, G., Horváth, G., 2012. How can horseflies be captured by solar panels? A new concept of tabanid traps using light polarization and electricity produced by photovoltaics. *Veterinary Parasitology* 189, 353-365.
- Bolker, B.M., Brooks, M.E., Clark, C.J., Geange, S.W., Poulsen, J.R., Stevens, M.H.H., White, J.-S.S., 2009. Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution* 24, 127-135.
- Burnett, A.M., Hays, K.L., 1974. Some influences of meteorological factors on flight activity of female horse flies (Diptera: Tabanidae). *Environmental entomology* 3, 515-521.
- Chvála, M., Lyneborg, L., Moucha, J., 1972. The horse flies of Europe (Diptera, Tabanidae). *Entomological Society of Copenhagen*, 498 p.
- Cooksey, L.M., Wright, R.E., 1987. Flight range and dispersal activity of the host-seeking horse fly, *Tabanus abactor* (Diptera, Tabanidae), in north central Oklahoma. *Environmental Entomology* 16, 211-217.
- Crawley, M.J., 2007. *The R Book*. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, England, 942 p.
- Dale, W.E., Axtell, R.C., 1975. Flight of the salt marsh Tabanidae (Diptera), *Tabanus nigrovittatus*, *Chrysops atlanticus* and *C. fuliginosus*: correlation with temperature, light, moisture and wind velocity. *Journal of Medical Entomology* 12, 551-557.
- Desquesnes, M., Biteau-Coroller, F., Bouyer, J., Dia, M.L., Foil, L., 2009. Development of a mathematical model for mechanical transmission of trypanosomes and other pathogens of cattle transmitted by tabanids. *International Journal for Parasitology* 39, 333-346.
- Foil, L., Foil, C., 1988. Dipteran parasites of horses. *Equine practice* 10, 21-38.

Biting behaviour of Tabanidae on cattle in mountainous summer pastures

- Foil, L.D., Hogsette, J.A., 1994. Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies. *Revue Scientifique et Technique* 13, 1125-1158.
- Foil, L.D., Issel, C.J., 1991. Transmission of retroviruses by arthropods. *Annual Reviews of Entomology* 36, 355-381.
- 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*). *Am J Vet Res* 44, 155-156.
- Gibson, G., Torr, S.J., 1999. Visual and olfactory responses of haematophagous Diptera to host stimuli. *Medical and Veterinary Entomology* 13, 2-23.
- Gilles, J., David, J.F., Duvallet, G., De La Rocque, S., Tillard, E., 2007. Efficiency of traps for *Stomoxys calcitrans* and *Stomoxys niger niger* on Reunion Island. *Medical and Veterinary Entomology* 21, 65-69.
- Hackenberger, B.K., Jarić, D., Krčmar, S., 2009. Distribution of tabanids (Diptera: Tabanidae) along a two-sided altitudinal transect. *Environmental Entomology* 38, 1600-1607.
- Hans, A., Poncon, N., Zientara, S., 2012. Epidemiology of equine infectious anemia in France and in Europe from 1994 to 2011. *Bulletin De l'Académie Vétérinaire De France* 165, 27-34.
- Hart, B.L., 1992. Behavioral adaptations to parasites: an ecological approach. *Journal of Parasitology* 78, 256-265.
- Hollander, A.L., Wright, R.E., 1980. Impact of tabanids (Diptera: Tabanidae) on cattle: blood meal size and preferred feeding sites. *Journal of Economic Entomology* 73, 431-433.
- Horváth, G., Blahó, M., Kriska, G., Hegedüs, R., Geric, B., Farkas, R., Akesson, S., 2010. An unexpected advantage of whiteness in horses: the most horsefly-proof horse has a depolarizing white coat. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 277, 1643-1650.
- Hribar, L.J., Leprince, D.J., Foil, L.D., 1992. Feeding sites of some Louisiana Tabanidae (Diptera) on fenvalerate-treated and control cattle. *Journal of Economic Entomology* 85, 2279-2285.
- Hughes, R.D., Duncan, P., Dawson, J., 1981. Interactions between Camargue Horses and Horseflies (Diptera: Tabanidae). *Bulletin of Entomological Research* 71, 227-242.
- Jacquet, P., Lienard, E., Franc, M., 2010. Bovine besnoitiosis: Epidemiological and clinical aspects. *Veterinary Parasitology* 174, 30-36.
- Konstantinov, S.A., 1993. The attack distance and the range and nature of the daily flight dispersion of horseflies in the genus *Hybomitra* (Diptera: Tabanidae). *Parazitologija* 27, 419-426.
- Krčmar, S., Marić, S., 2006. Analysis of the feeding sites for some horse flies (Diptera, Tabanidae) on a human in Croatia. *Collegium Antropologicum* 30, 901-904.
- Körner, C., 2007. The use of 'altitude' in ecological research. *Trends in Ecology & Evolution* 22, 569-574.
- Lewis, D.J., Leprince, D.J., 1981. Horse flies and Deer flies (Diptera: Tabanidae) feeding on cattle in southwestern Quebec. *Canadian Entomologist* 113, 883-886.
- Mihok, S., 2002. The development of a multipurpose trap (the Nzi) for tsetse and other biting flies. *Bulletin of Entomological Research* 92, 385-403.
- Mihok, S., Mulye, H., 2010. Responses of tabanids to Nzi traps baited with octenol, cow urine and phenols in Canada. *Medical and Veterinary Entomology* 24, 266-272.
- Mohamed-Ahmed, M.M., Mihok, S., 2009. Alighting of Tabanidae and muscids on natural and simulated hosts in the Sudan. *Bulletin of Entomological Research* 99, 561-571.
- Mooring, M.S., Blumstein, D.T., Reisig, D.D., Osborne, E.R., Niemeyer, J.M., 2007. Insect-repelling behaviour in bovines: role of mass, tail length, and group size. *Biological Journal of the Linnean Society* 91, 383-392.
- Mullen, G.R., Durden, L.A., 2002. *Medical and veterinary entomology*. Academic Press, Amsterdam ; Boston, xv, 597 p. pp.

- Mullens, B.A., Gerhardt, R.R., 1979. Feeding-behavior of some Tennessee Tabanidae. *Environmental Entomology* 8, 1047-1051.
- Mullens, B.A., Lii, K.S., Mao, Y., Meyer, J.A., Peterson, N.G., Szijj, C.E., 2006. Behavioural responses of dairy cattle to the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, in an open field environment. *Medical and Veterinary Entomology* 20, 122-137.
- Muzari, M.O., Skerratt, L.F., Jones, R.E., Duran, T.L., 2010. Alighting and feeding behaviour of tabanid flies on horses, kangaroos and pigs. *Vet Parasitol* 170, 104-111.
- Perich, M.J., Wright, R.E., Lusby, K.S., 1986. Impact of horse flies (Diptera: Tabanidae) on beef-cattle. *Journal of Economic Entomology* 79, 128-131.
- Phelps, R.J., Holloway, M.T.P., 1990. Alighting sites of female Tabanidae (Diptera) at Rekomitjie, Zimbabwe. *Medical and Veterinary Entomology* 4, 349-356.
- Ralley, W.E., Galloway, T.D., Crow, G.H., 1993. Individual and group-behavior of pastured cattle in response to attack by biting flies. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 71, 725-734.
- Raymond, H.L., Rousseau, F., 1987. Abundance of horse flies (Diptera, Tabanidae) and reactions of cattle in a traditional farm of French-Guiana. *Acta Oecologica-Oecologia Applicata* 8, 125-134.
- Sheppard, C., Wilson, B.H., 1976. Flight range of Tabanidae in a Louisiana bottomland hardwood forest. *Environmental Entomology* 5, 752-754.
- Sheppard, C., Wilson, B.H., 1977. Relationship of horse fly host seeking activity to edge of wooded areas in southern Louisiana. *Environmental Entomology* 6, 781-782.
- Team, R.C. 2013. R: A Language and Environment for Statistical Computing (Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing).
- Thomas, G.D., Berry, I.L., Berkebile, D.R., Skoda, S.R., 1989. Comparisons of three sampling methods for estimating adult stable fly (Diptera: Muscidae) populations. *Environmental Entomology* 18, 513-520.
- Torr, S.J., Mangwiro, T.N.C., 2000. Interactions between cattle and biting flies: effects on the feeding rate of tsetse. *Medical and Veterinary Entomology* 14, 400-409.
- Van Hennekeler, K., Jones, R.E., Skerratt, L.F., Muzari, M.O., Fitzpatrick, L.A., 2011. Meteorological effects on the daily activity patterns of tabanid biting flies in northern Queensland, Australia. *Medical and Veterinary Entomology* 25, 17-24.
- Warnes, M.L., Finlayson, L.H., 1987. Effect of host behavior on host preference in *Stomoxys calcitrans*. *Medical and Veterinary Entomology* 1, 53-57.
- Wilson, B.H., 1968. Reduction of Tabanid populations on cattle with sticky traps baited with dry ice. *Journal of Economic Entomology* 61, 827-829.
- Zardi, D., Whiteman, D., 2012. Diurnal mountain wind systems, In: *Mountain weather research and forecasting*. Springer, Berlin, p. 750.
- Zuur, A., Ieno, E.N., Walker, N., Saveliev, A.A., Smith, G.M., 2009. *Mixed Effects Models and Extensions in Ecology with R*, Vol XXII. Springer Science+Buisness Media, New-York, USA, 574 p.

Table 1. Ranges of environmental variables with their mean values over the period of the study (six days)

Variable	Category	Mean	Min	Max	Unit
Temperature	Weather	20.0	15.8	23.6	°C
Humidity	Weather	37.9	22.1	51.9	%
Wind speed	Weather	0.933	0.300	2.200	m/s
Altitude	Altitude	2016	1851	2263	m a.s.l.
MPSF*	Landscape	3.60	0	6.76	ha
MPSUF*	Landscape	6.00	1.74	12.56	ha
MPARF*	Landscape	364.2	0	1938.3	m/ha
MPARUF*	Landscape	300.2	100.0	687.8	m/ha

*Mean patch size for forested patches (MPSF), mean patch size for unforested patches (MPSUF), mean perimeter-area ratio for forested patches (MPARF), and mean perimeter-area ratio for unforested patches (MPARUF).

Table 2. Collected Tabanidae species per tribe and the number of individuals per species

Tabanini	2563
<i>Tabanus bromius</i> Linnaeus 1758	999
<i>Hybomitra montana</i> (Meigen 1820)	544
<i>Hybomitra auripila</i> (Meigen 1820)	319
<i>Hybomitra caucasica</i> (Enderlein 1925)	293
<i>Tabanus glaucopis</i> Meigen 1820	187
<i>Hybomitra distinguenda</i> (Verrall 1909)	95
<i>Tabanus sudeticus</i> Zeller 1842	38
<i>Tabanus tergestinus</i> Egger 1859	26
<i>Tabanus maculicornis</i> Zetterstedt 1842	25
<i>Tabanus rupium</i> (Brauer 1880)	23
<i>Atylotus fulvus</i> (Meigen 1804)	14
Diachlorini	1105
<i>Philipomyia aprica</i> (Meigen 1820)	1104
<i>Dasyrhamphis ater</i> (Rossi 1790)	1
Haematopini	253
<i>Haematopota pluvialis</i> (Linnaeus 1758)	241
<i>Haematopota scutellata</i> (Olsufjev, Moucha & Chvala 1964)	12

Table 3a. GLMM results for tabanid landings depending on meteorological variables (only significant effects are indicated)

	Estimate (SE)	z-value	p-value
(Intercept)	0.755 (0.103)	7.349	< 0.001
Wind:noon	-1.014 (0.219)	-4.622	< 0.001
Temperature:noon	0.717 (0.143)	5.013	< 0.01
Temperature:afternoon	0.521 (0.178)	2.921	< 0.001
Humidity	-0.340 (0.082)	-4.150	< 0.001

Table 3b. GLMM results for tabanid landing depending on meteorological variables and altitude (only significant effects are indicated)

	Estimate (SE)	z-value	p-value
(Intercept)	0.844 (0.103)	8.152	< 0.001
Wind:noon	- 0.825 (0.225)	-3.662	< 0.001
Temperature:noon	0.474 (0.173)	2.732	< 0.01
Humidity	-0.340 (0.082)	-1.499	< 0.001
Altitude	-0.279 (0.135)	-2.069	< 0.05
Temperature:morning	-0.261 (0.123)	-2.113	< 0.05

Table 3c. GLMM results for Tabanini landings depending on meteorological variables (only significant effects are indicated)

	Estimate (SE)	z-value	p-value
(Intercept)	-0.456 (0.265)	1.721	0.085
Wind:noon	-1.244 (0.407)	-3.052	< 0.01
Noon	-0.876 (0.349)	-2.510	<0.05
Morning	-0.835 (0.352)	-2.371	<0.05
Humidity	-0.733 (0.116)	-6.288	< 0.001
Temperature:morning	-0.385 (0.150)	-2.566	< 0.01

Table 3d. GLMM results for Diachlorini landings depending on meteorological variables (only significant effects are indicated)

	Estimate (SE)	z-value	p-value
(Intercept)	-0.925 (0.212)	-4.344	< 0.001
Wind:noon	-1.284 (0.400)	-3.209	< 0.01
Wind:morning	-0.798 (0.334)	-2.387	< 0.05
Humidity:noon	-0.746 (0.207)	-3.606	< 0.001

Table 3e. GLMM results for Haematopini landings depending on meteorological variables (only significant effects are indicated)

	Estimate (SE)	z-value	p-value
(Intercept)	-1.548 (0.330)	-4.687	< 0.001
Temperature	1.525 (0.238)	6.402	< 0.001
Noon	0.921 (0.356)	2.591	< 0.01
Wind	-0.564 (0.219)	-2.576	< 0.01

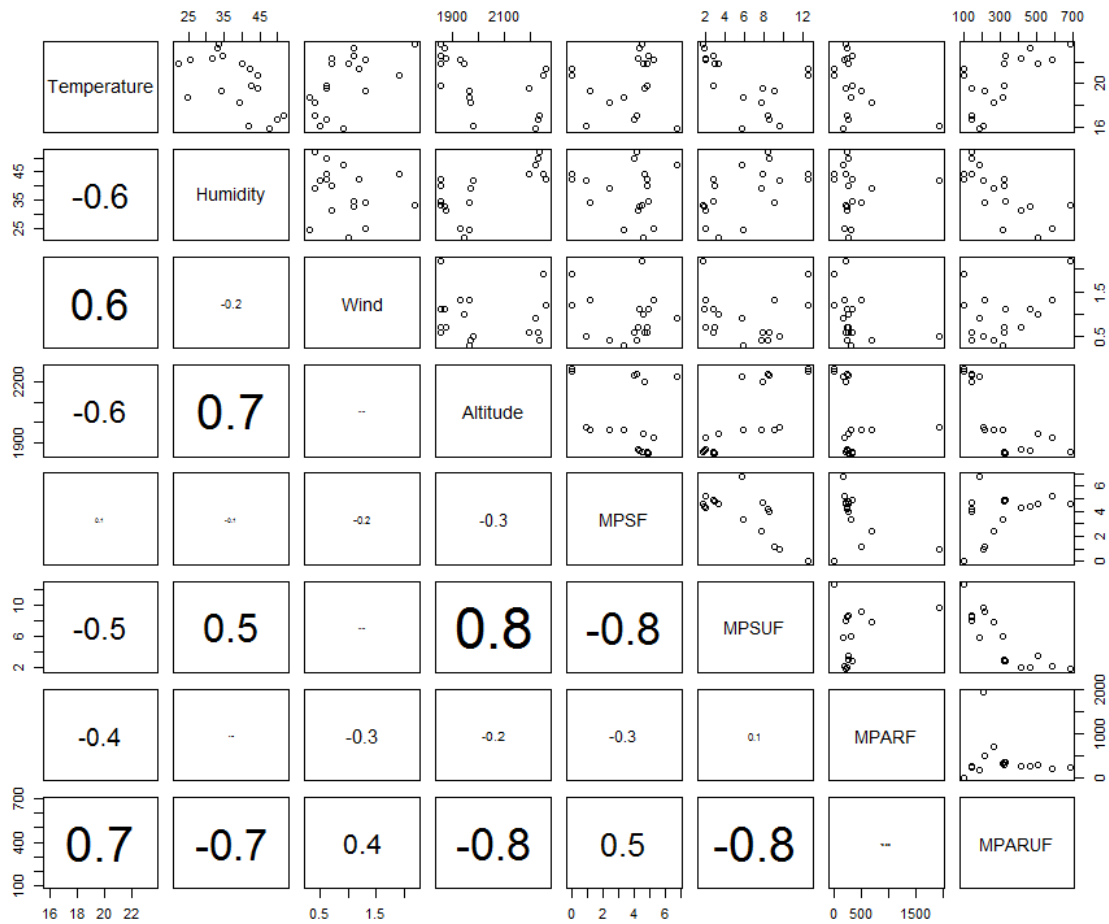


Fig. 1. Plot of the correlations between the environmental variables tested using Pearson’s correlation test

Biting behaviour of Tabanidae on cattle in mountainous summer pastures

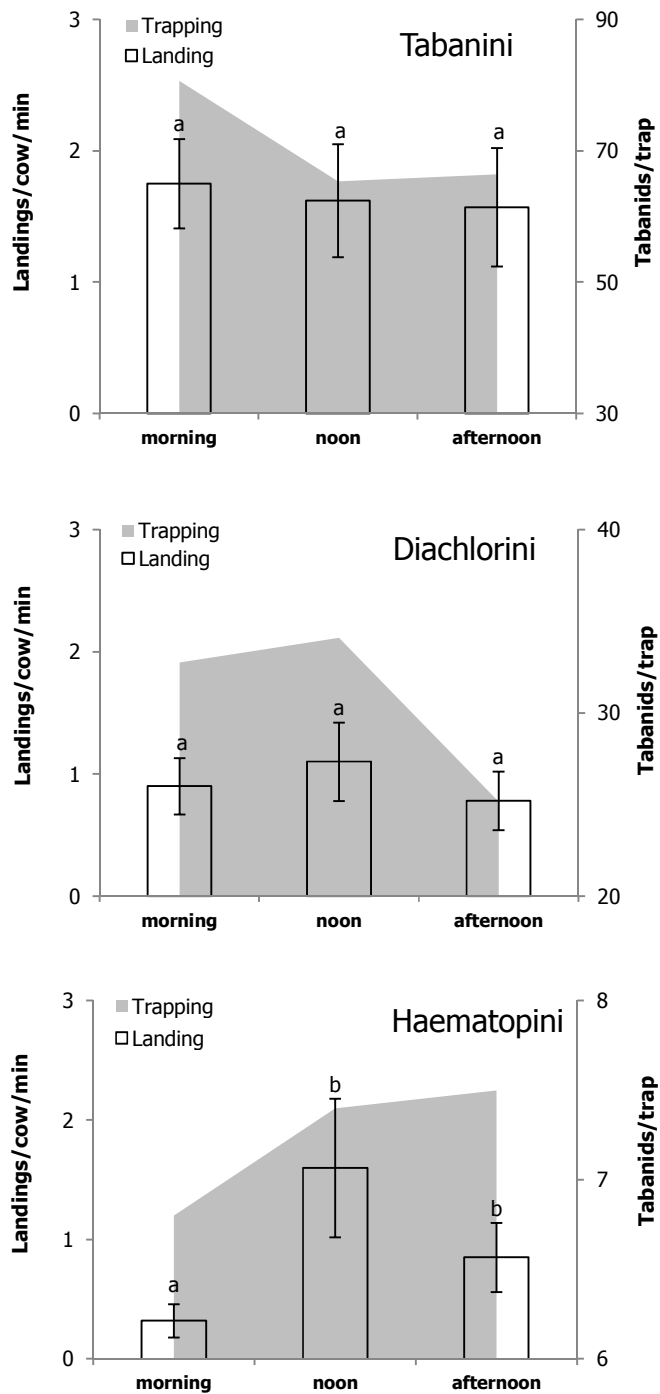


Fig. 2. Tabanid landings per cow per minute (mean \pm SE) and tabanid catches per trap (mean) recorded per period of the day for each tribe (Tabanini, Diachlorini and Haematopini). Differences between landings and period were tested using the Kruskal-Wallis test and Bonferroni-corrected Mann-Whitney pairwise comparisons ($N=60$). Significant differences ($P \leq 0.01$) are represented by different letters (a, b).

Biting behaviour of Tabanidae on cattle in mountainous summer pastures

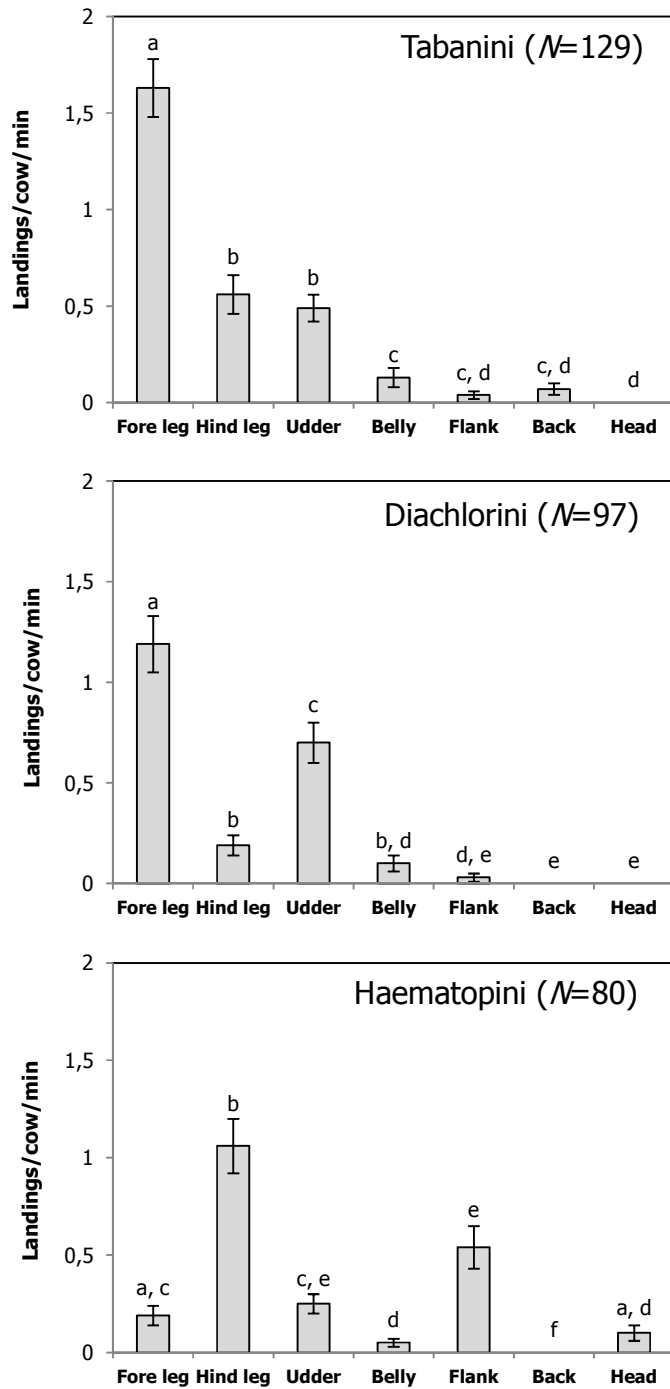


Fig. 3. Tabanid landings per cow per minute according to where flies alighted on the body of the cow and the tribe (cows without any landings were excluded from the count for *N*). Differences between landings and body parts were tested using the Kruskal-Wallis test and Bonferroni-corrected Mann-Whitney pairwise comparisons. Significant differences ($P < 0.05$) are represented by different letters (a, b, c, d, e, f).

Biting behaviour of Tabanidae on cattle in mountainous summer pastures

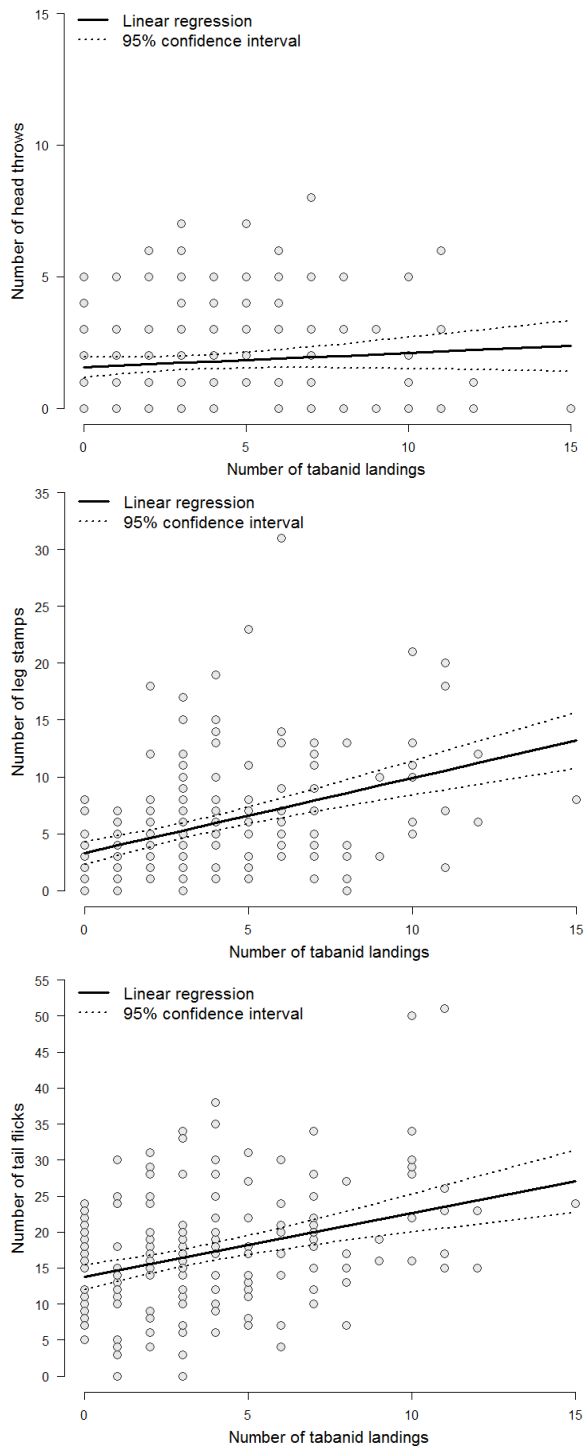


Fig. 4. Plots of the number of host defensive reactions (head throwing, leg stamping and tail flicking) vs. the number of tabanid landings and the linear regression with a 95% confidence interval for each plot. The r^2 values were highly significant ($P < 0.001$) for leg stamping ($r^2 = 0.181$) and tail flicking ($r^2 = 0.115$), but not significant for head throwing ($r^2 = 0.009$, $P=0.113$).

2.3. Comportement trophique des Tabanidae

2.3.1. Des femelles plutôt opportunistes

Les insectes hématophages se nourrissent sur un grand nombre d'espèces hôtes différentes mais le degré de spécificité envers ces hôtes est très variable d'un insecte à l'autre (Lehane 2005). Les insectes spécialistes sont entièrement dépendants d'une seule espèce hôte, alors que les insectes généralistes sont plus disposés à piquer un large éventail d'hôtes. Il existerait d'ailleurs un lien entre les capacités de déplacement des insectes et le nombre d'hôtes qu'ils utilisent. Les insectes généralistes vont généralement se nourrir selon la disponibilité en hôtes, on parle aussi d'insectes opportunistes.

L'identification des repas de sang chez les arthropodes hématophages a révolutionné notre compréhension des interactions hôtes-ectoparasites et de l'écologie des maladies infectieuses transmises par les vecteurs (Kent 2009). Elle nous apporte un regard neuf concernant l'évolution de la spécificité d'hôte, l'influence du choix des hôtes et du comportement de piqûre sur la transmission des agents pathogènes, et l'impact des infestations d'ectoparasites sur les hôtes domestiques et sauvages. Chez les taons, il est primordial de connaître l'intensité des piqûres et les hôtes préférentiels afin d'évaluer le niveau de nuisance et le rôle potentiel dans la transmission mécanique de certains agents pathogènes (Magnarelli & Anderson 1980).

Les femelles taons, plus spécifiquement les Tabaninae, se nourrissent préférentiellement sur des grands mammifères comme les vaches, les chevaux ou les cerfs en région tempérée. Toutefois, leur spectre d'hôtes peut être beaucoup plus varié. L'Homme est un hôte privilégié pour les espèces plus petites, *Haematopota* sp. et *Chrysops* sp. Les autres hôtes qui ont été identifiés incluent des hippopotames, des buffles, des macropodes, des cochons, des chiens, des lapins, des rongeurs sauvages, des varans, des tortues (Wilson & Richards 1969; Magnarelli & Anderson 1980; Gouteux *et al.* 1989; Muzari *et al.* 2010a). Des *Chrysops* sp. ont également été observés sur différentes espèces d'oiseaux : corbeaux, canards, merles... (Mullen & Durden 2002).

En milieu tempéré, seules deux études ont été réalisées pour identifier les repas de sang à partir de méthodes immunologiques (réaction de précipitation). Que ce soit en zone mixte prairie – forêt (Connecticut, USA) ou dans les estuaires et les zones alluviales (Louisiane, USA), ces études ont montré que les femelles se gorgeaient principalement sur des bovins (57-74%) et des équins (14-23%). Le taux de repas mixtes bovin-équidé était compris entre 4% et 7%. Les cerfs (4-9%) étaient moins piqués mais ils étaient malgré tout considérés comme des sources de sang importantes, notamment dans les zones où le bétail était absent (Wilson & Richards 1969; Magnarelli & Anderson 1980). L'identification, pour une même espèce, d'hôtes différents et de repas mixtes (deux hôtes ou plus) suggère un comportement plutôt opportuniste des femelles taons.

En Australie, Muzari *et al.* (2010a) ont également observé la présence de repas mixtes (deux ou trois hôtes détectés) chez trois espèces de taons, mais avec des taux bien supérieurs (>20%). La méthode utilisée (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) a permis d'identifier des repas de sang jusqu'à six jours après ingestion. Les résidus sanguins provenant des cycles gonotrophiques précédents pouvaient ainsi être détectés.

2.3.2. Comportement trophique des taons dans les Pyrénées

Article 3 : Blood-feeding patterns of horse flies in the French Pyrenees: implications for the epidemiology of re-emerging bovine besnoitiosis in western Europe

F. Baldacchino, L. Gardes, E. De Stordeur, P. Jay-Robert & C. Garros.

Veterinary Parasitology, in press.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.10.009>

Résumé

Pour mieux comprendre la diffusion de la besnoitiose bovine en Europe, il est nécessaire de bien connaître le comportement de piqûre de ses vecteurs, les taons. Dans les Pyrénées, la maladie est enzootique et les estives sont des milieux propices à la transmission de *Besnoitia besnoiti* entre animaux d'un même troupeau et entre animaux de troupeaux différents. Par ailleurs, le rôle de la faune sauvage dans la persistance de la maladie reste incertain ; en Espagne, 61 échantillons de sérums de cerfs ont été détectés positifs à *Besnoitia* sp. (Gutiérrez-Expósitoa *et al.* 2013).

Pour cette étude, nous avons analysé les repas de sang de femelles taons capturées dans les Pyrénées. Une partie des femelles testées a été collectée dans les pâturages d'altitude prospectés en 2011 (La Mouline et Mantet) (Article 1). Une autre partie des femelles a été collectée dans le parc animalier des Angles qui présente au public l'ensemble des espèces d'ongulés sauvages des Pyrénées. Six pièges Nzi, avec de l'octenol contenu dans des sachets en polyéthylène, ont été installés au sein du parc en juillet 2012. Ces pièges ont été relevés tous les 2-3 jours. Toutes les femelles collectées ont été conservées dans de l'éthanol 95°. Ces femelles ont été identifiées à l'aide des clés de Chvála (1972), puis disséquées pour évaluer la présence de sang dans l'intestin (Figure 12). Seules les femelles avec des traces de sang visibles ont été analysées par biologie moléculaire.

Pour pouvoir interpréter les résultats sur l'identification des repas de sang, il faut comparer les profils trophiques de chaque espèce avec les effectifs des animaux disponibles dans leur environnement. Pour les estives, des estimations « qualitatives » des densités d'animaux sauvages ont été obtenues auprès des Réserves Naturelles Catalanes (observations d'animaux) et de la fédération départementale des chasseurs des Pyrénées-Orientales (prélèvements de chasse). Pour le parc animalier, les « forage ratio » (taux de piqûre sur une espèce hôte) ont été calculés en divisant le pourcentage des espèces hôtes identifiées dans les repas de sang par le pourcentage de ces mêmes espèces dans le cheptel global du parc (Hess *et al.* 1968) ; et les distances de vol minimales des femelles gorgées ont été obtenues d'après la localisation des pièges et des hôtes identifiés.

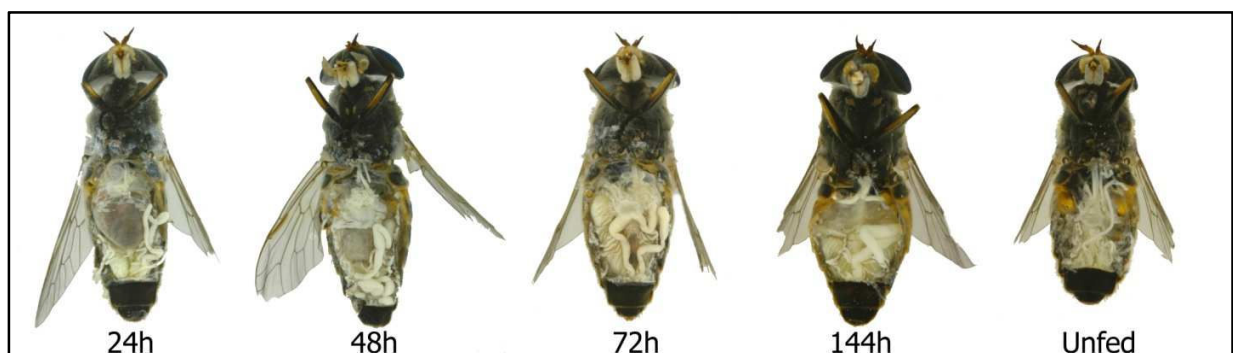


Figure 12. Femelles *T. bromius* disséquées 24h, 48h, 72h et 144h après gorgement complet
Une femelle non gorgée (« unfed ») a également été disséquée pour comparaison.

Les analyses PCR ont été mises au point en collaboration avec l'UMR CMAEE, CIRAD. Nous avons utilisé une technique PCR spécifique d'espèces avec amplification de fragments d'ADN du cytochrome *b* dans des conditions similaires à Garros *et al.* (2011). Les hôtes recherchés étaient : vache, cheval, sanglier, mouton/mouflon, chèvre, cerf, chevreuil et isard (aussi appelé chamois pyrénéen). Les identifications du cheval et du sanglier étaient basées sur des PCR simplex alors que les identifications des ruminants domestiques et sauvages étaient basées sur une PCR multiplex.

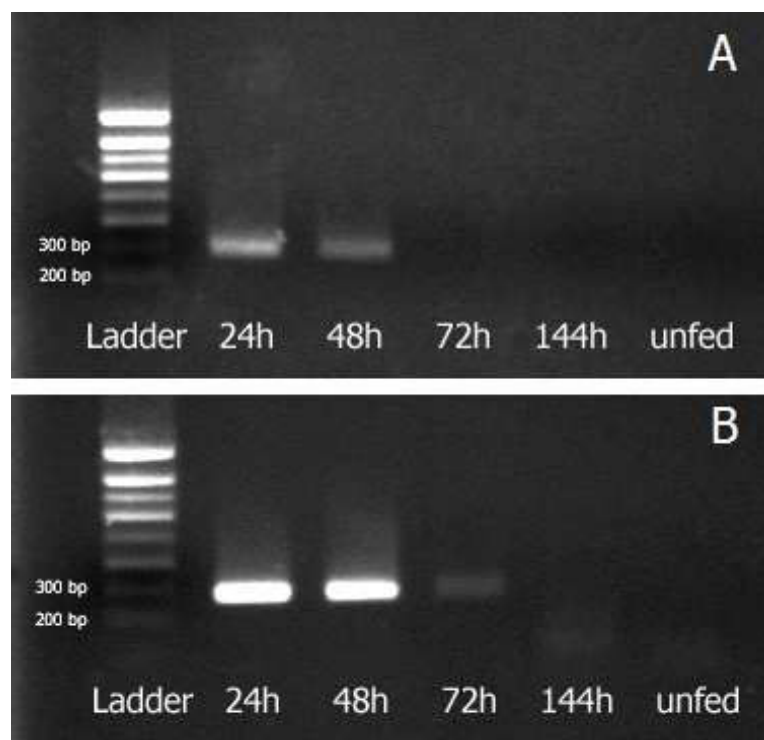


Figure 13. Amplification d'ADN par (A) PCR multiplex et (B) PCR simplex. Les extraits d'ADN sont issus de femelles *T. bromius*, gorgées sur sang de bovin citraté, 24h, 48h, 72h et 144h après digestion. Une femelle non gorgée (« unfed ») a été analysée comme témoin négatif.

Nous avons également testé une PCR simplex spécifique vache pour évaluer la sensibilité de la technique PCR en fonction de la digestion du repas de sang. Pour cela, des femelles *T. bromius* ont été gorgées complètement sur des nourrisseurs Hemotek® remplis de sang de bovin citraté et recouverts d'un Parafilm® percé au milieu. Les femelles ont été tuées par le froid pour constituer

4 groupes ($N=6$) selon le temps de digestion : 24, 48, 72 et 144h. Des femelles non gorgées ($N=6$) constituaient le groupe contrôle. Avec la PCR simplex vache, toutes les femelles ont réagi positivement jusqu'à 72h après le repas de sang. Avec la PCR multiplex ruminants, le succès des analyses diminue avec le temps de digestion : 6/6 à 24h, 3/6 à 48h et 0/6 à 72h (Figure 13). Aucun résultat positif n'a été détecté 144h après digestion contrairement à la technique ELISA (Muzari *et al.* 2010a). En conséquence, la forte proportion de repas mixtes observée par Muzari *et al.* (2010) s'explique par la détection du dernier repas de sang et des résidus du cycle gonotrophique précédent (entre 3 et 11 jours auparavant). Avec la PCR, la détection d'un repas mixte correspond à un vrai changement d'hôtes après interruption du gorgement de la femelle.

En 2011, 2019 femelles ont été collectées dans les estives et, en 2012, 1746 femelles ont été collectées dans le parc animalier. La proportion de femelles gorgées parmi les femelles collectées était faible (2,2%), mais similaire aux collectes menées en Australie (3,2% de femelles gorgées) avec les mêmes pièges Nzi (Muzari *et al.* 2010a). La proportion de repas de sang identifiés est très satisfaisante avec 44/49 et 37/40 résultats positifs pour les femelles collectées, respectivement, dans les estives et dans le parc.

À La Mouline, l'espèce la plus abondante était *P. aprica*, 70% des repas identifiés correspondaient à du cerf et 30% à de la vache (Figure 14). À Mantet, les principales espèces étaient *P. aprica*, *T. bromius* et *H. auripila*. Les taons ont piqué des vaches (52%), des cerfs (20%), des sangliers (16%), des chevaux (8%) et un mouton (4%). Un seul repas mixte (vache/cheval) a été détecté sur une femelle *T. bromius* collectée à Mantet. Pour *T. bromius* et *H. auripila*, les profils trophiques correspondent à la disponibilité en hôtes en fonction du lieu et du moment de capture dans la saison. Ces résultats confirment le caractère opportuniste des femelles taons. La forte proportion de cerf identifiée chez *P. aprica* est plus surprenante, en particulier à Mantet où la densité en cerf élaphe est faible.

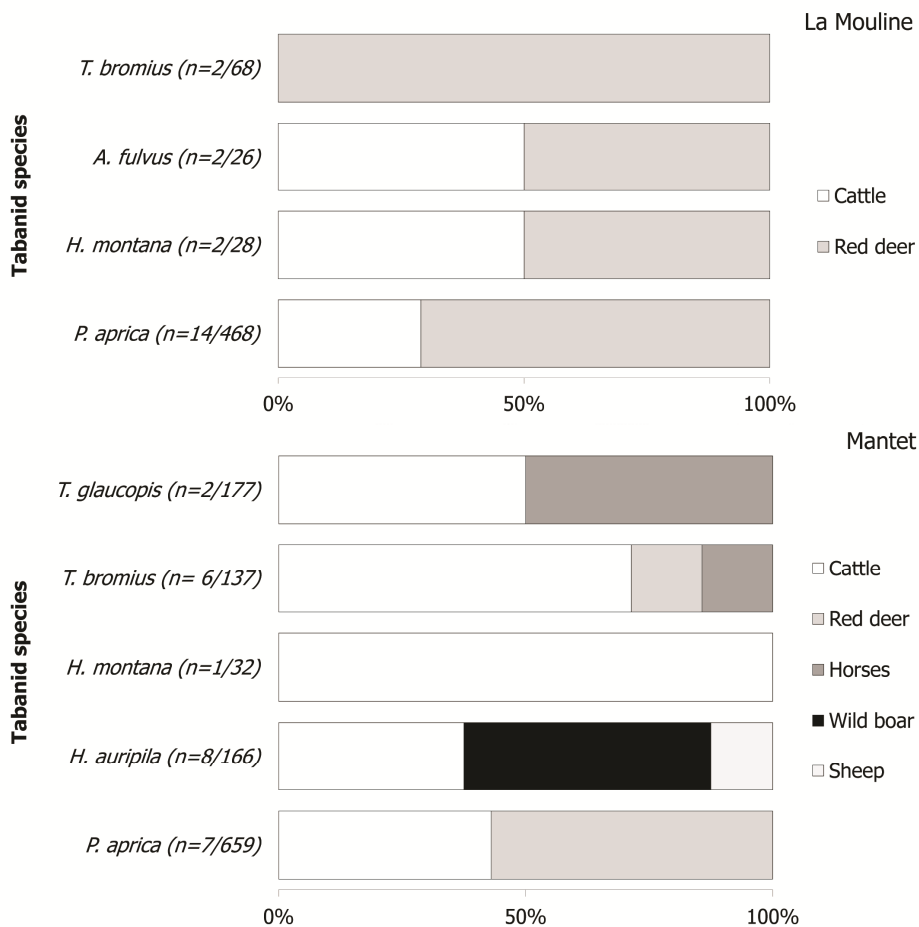


Figure 14. Origine des repas de sang de différentes espèces de taons collectées dans les pâtures

Au parc animalier, *T. bromius* était l'espèce largement majoritaire dans les piégeages (90%). Les femelles *T. bromius* se sont gorgées sur cerf (85%), bison (9%) et sanglier (6%) (Figure 15). Des analyses de séquençages ont aussi montré que les extraits d'ADN identifiés comme du cerf n'étaient pas du daim ou du renne. Comme dans les estives, aucune femelle ne s'est gorgée sur des petits ruminants sauvages au sein du parc. D'une part, les grands ongulés sont sans doute plus attractifs car ils expriment davantage de stimuli visuels et olfactifs (Gibson & Torr 1999). D'autre part, les petits ongulés sont certainement plus sensibles et plus réactifs aux piqûres de taons, ce qui diminue le succès de gorgement (Raymond & Rousseau 1987).

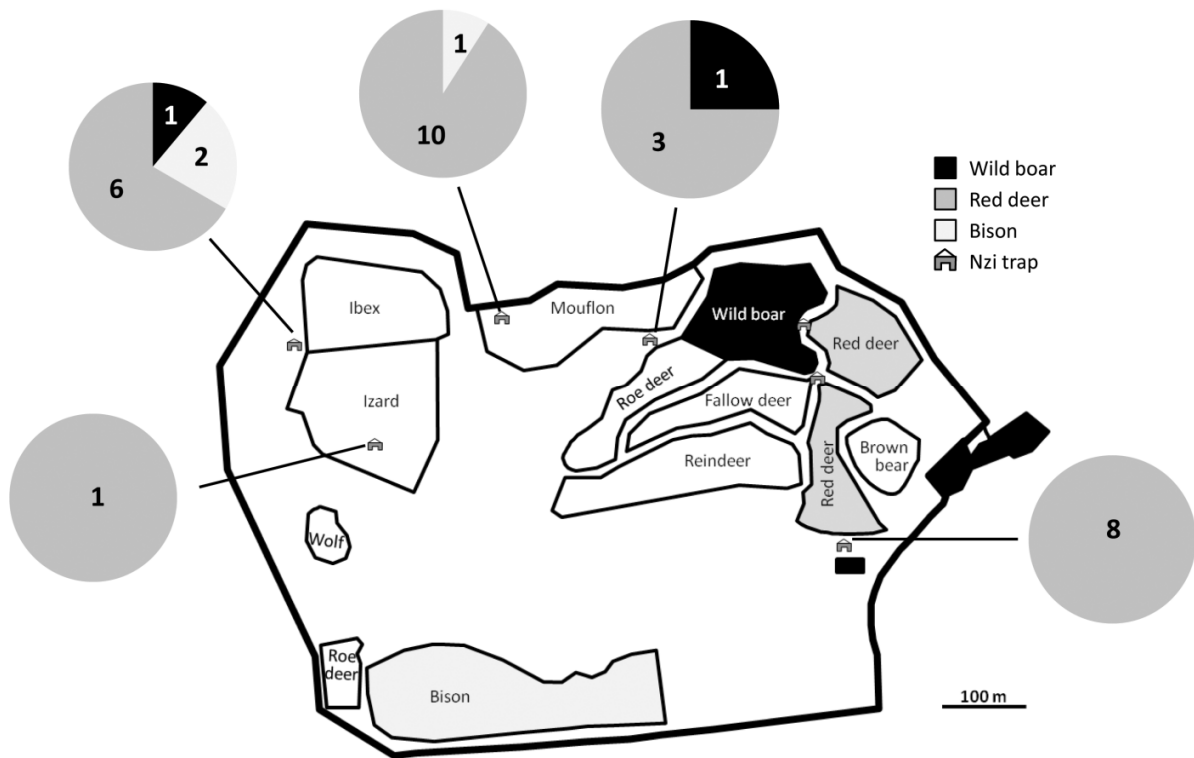


Figure 15. Origine des repas de sang chez des femelles *T. bromius* dans le parc animalier des Angles. Les effectifs du parc sont : mouflons (44), daims (36), cerfs (33), isards (25), bouquetins pyrénéens (16), loups (11), rennes (10), chevreuils (6), bison (5), marmottes (5), ours (2).

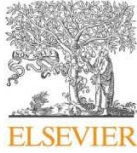
Nos observations dans les estives sont cohérentes avec les précédentes études et confirment que les femelles tabanides sont des diptères hématophages opportunistes avec une préférence pour les grands mammifères (Wilson & Richards 1969; Magnarelli & Anderson 1980). Étonnamment, nous avons détecté une proportion importante de repas sur cerf, en particulier pour *P. aprica*. Les résultats du parc animalier confirment que le cerf est un hôte de choix surtout en l'absence de bétail. L'augmentation des taux d'occupation du cerf en France, notamment dans les forêts d'altitude, depuis une dizaine d'années est un facteur très favorable à l'abondance des populations de taons dans les estives (ONCFS 2012).

Article 3 : Blood-feeding patterns of horse flies in the French Pyrenees: implications for the epidemiology of re-emerging bovine besnoitiosis in western Europe

F. Baldacchino, L. Gardes, E. De Stordeur, P. Jay-Robert & C. Garros.

Veterinary Parasitology, in press.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.10.009>



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

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



Short Communication

Blood-feeding patterns of horse flies in the French Pyrenees

F. Baldacchino^{a,*}, L. Gardès^b, E. De Stordeur^a, P. Jay-Robert^a, C. Garros^b

^a UMR 5175, Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive (CEFE), Université Paul-Valéry (UM3), 34199 Montpellier Cedex 5, France

^b UMR 1309 CMAEE, CIRAD, INRA, 34398 Montpellier, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 September 2013
Received in revised form 10 October 2013
Accepted 13 October 2013

Keywords:

Tabanidae
Blood meal
Cytochrome *b*
Livestock
Wild ungulates
Besnoitiosis

ABSTRACT

Horse flies can mechanically transmit *Besnoitia besnoiti*, the agent of bovine besnoitiosis. Although previously limited to enzootic areas, especially the French Pyrenees Mountains, bovine besnoitiosis is now considered a re-emerging disease in western Europe. To improve understanding of the role of horse flies as mechanical vectors, this study investigated their blood-feeding ecology in the eastern French Pyrenees, in two high-altitude summer pastures whose main domestic ungulates were cattle, and in a wildlife park with native fauna. Species-specific PCR assays were conducted to identify the sources of blood meals: wild boar, horse, cattle (or bison), sheep (or mouflon), goat, red deer, roe deer and izard (or Pyrenean chamois). In La Mouline pasture, tabanids ($N=20$) fed on red deer (70%) and cattle (30%). In Mantet pasture, tabanids ($N=24$) fed on cattle (52%), red deer (20%), wild boar (16%), horse (8%) and sheep (4%). In the wildlife park, *Tabanus bromius* ($N=32$), the most abundant species collected, fed on red deer (85%), bison (9%) and wild boar (6%). Despite relatively high densities in both the pastures and in the wildlife park, small wild ungulates (izard, mouflon and roe deer) were not detected as a source of blood meals. Only two mixed blood meals were identified in two specimens of *T. bromius*: cattle/horse for the specimen collected in the pastures, and bison/wild boar for the specimen collected in the wildlife park. Our findings showed that tabanids display a level of opportunistic feeding behaviour, in addition to a preference for red deer, the latter being particularly true for *Philipomyia aprica*, the most abundant species collected in the pastures.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Recent epidemiological data confirm an increased number of cases and a geographic expansion of bovine besnoitiosis in cattle herds in Europe (Alvarez-García et al., 2013). Previously, this disease was only encountered in enzootic areas, especially the French Pyrenees Mountains (Jacquet et al., 2010). Arthropods such as horse flies may play a role in the mechanical transmission of *B. besnoiti* from cattle with chronic or asymptomatic infections. The mechanical transmission of *B. besnoiti* between cattle has

been demonstrated in experiments with African tabanids (Bigalke, 1968). The persistent feeding behaviour of horse flies is favourable to mechanical transmission, although they most often continue to bite the same host following an interrupted meal (Desquesnes et al., 2009). Mechanical transmission principally occurs within a group of animals: for example, in a herd or at gathering points. Pyrenean summer pastures could be considered areas with a high risk of transmission, as cattle there are highly exposed to biting flies, and animals with chronic or asymptomatic infections can mix with healthy livestock in the same herd. Moreover, cattle graze near wild ruminants in mountain pastures; the role of wild ungulates as a wild reservoir of *B. besnoiti* remains unknown. In a recent serosurvey of *B. besnoiti* sp. infection in wild ruminants in Spain, sera samples from roe deer and red deer were seropositive, but

* Corresponding author at: Route de Mende, 34199, Montpellier cedex 5, France. Tel.: +33 4 67 14 23 21; fax: +33 4 67 14 24 59.
E-mail address: frederic.baldacchino@cefe.cnrs.fr (F. Baldacchino).

Table 1

Estimated relative densities of animals in each valley during the summer of 2011.

	Cattle	Sheep	Goats	Red deer	Roe deer	Izards	Mouflons	Horses	Wild boar
La Mouline	Low	Very low	Absent	Low	Low	Low	Very low	Very low	Low
Mantet	High	Low ^a	Low	Very low	Very high	Very high	Very low	Very low	High

Absent ($N=0$), very low ($N=0.1-1$), low ($N=1.1-5$), high ($N=5.1-10$) and very high ($N>10$).
 N is the number of individuals per km².

^a A flock of sheep was only present in Mantet between mid- and end-June.

only one sample from each species was clearly identified as *B. besnoiti* (Gutiérrez-Expósito et al., 2013).

Understanding the biting intensity and blood-feeding behaviour of tabanids is crucial to assessing how problematic they are and their potential role as mechanical vectors (Magnarelli and Anderson, 1980). Although blood-meal analysis has been widely applied to haematophagous dipteran, especially mosquitoes, tabanids have received little attention in this area. Studies of tabanid feeding patterns have been conducted in North America (Magnarelli and Anderson, 1980; Wilson and Richards, 1969), Africa (Gouteux et al., 1989) and Australia (Muzari et al., 2010a), but previously none had been carried out in Europe. Moreover, all of these studies were based on immunological methods, which mainly detect species-specific targets, but might not distinguish between blood meals obtained from closely related host species (Mukabana et al., 2002). In this study, we considered that tabanid blood-meal sources might be identified with greater specificity and sensitivity using host species-specific PCR-based assays (Garros et al., 2011).

Using a molecular-based approach, this study investigated the blood-feeding patterns of horse flies in the French eastern Pyrenees. Tabanids were collected in summer pastures where mainly cattle are present, and in a wildlife park sheltering species representative of wild Pyrenean fauna. Our objectives were to estimate the proportion of feedings on domestic and wild ungulates, as well as the prevalence of mixed blood meals. To this end, PCR-based assays were optimized for tabanids, and their sensitivity to blood-meal digestion was determined. The implications for horse fly populations and the mechanical transmission of bovine besnoitiosis are discussed.

2. Materials and methods

2.1. Study areas and tabanid collection

Tabanids were captured in the French eastern Pyrenees, in high-altitude summer pastures in the valleys of La Mouline (2°14' E 42°37' N) and Mantet (2°18' E 42°28' N), and in the Les Angles Wildlife Park (2°04' E 42°34' N). The estimated relative densities of hosts in each valley are noted in Table 1. These estimates are based on sightings by park rangers and on harvest report from hunters.

The wildlife park is home to Pyrenean fauna still present in the natural environment (red deer [$N=33$], European roe deer [$N=6$], mouflon [$N=44$], izard [$N=25$], Spanish ibex [$N=16$], brown bear [$N=2$], wolf [$N=11$] and marmot [$N=5$]) or no longer present in the wild in this region for many centuries (European bison [$N=5$], reindeer [$N=10$]

and fallow deer [$N=36$]). This study site was chosen as all potential tabanid hosts are available in a small area (0.37 km²) and their exact densities are known, which is not the case in mountain pastures.

The sampling design in the summer pastures was the same as in the study by Baldacchino et al. (2013). In the wildlife park, six Nzi (Mihok, 2002) traps baited with octenol were set between or within the animal enclosures. The octenol was dispensed in polyethylene sachets as in Torr et al. (1997). Collections were made between 9 July and 1 August 2012. One trap was moved on 23 July because no flies were collected at the initial position. The tabanids were identified using Chvala's key (1972) and kept in 95% ethanol before molecular analysis.

2.2. Blood-meal digestion and species-specific PCR assays

To determine PCR sensitivity in relation to blood-meal digestion, *T. bromius* females were used, as this species is very common in Europe. Wild females were collected in the field, kept in screen cages under laboratory conditions (22–26 °C, 40–60% relative humidity) and supplied *ad libitum* with water and sucrose solution. 24 *T. bromius* were fed to repletion with citrated bovine blood provided with a Hemotek 5W1 Membrane Feeding System (Hemotek Ltd., Accrington, England). A Parafilm[®] membrane was stretched over the aperture of the meal reservoir of the feeder, and a small hole punctured in the middle of the membrane to allow a drop of blood to escape at the surface. Feeders were placed under the cages between 11:00 and 18:00. Flies ($n=6$) were killed in groups by freezing at 24, 48, 72 and 144 h after feeding and stored in 95% ethanol at –20 °C before analysis. The blood-meal size of fed females was assessed after dissection by weighing the gut. Unfed female tabanids were used as a control ($n=6$).

Host identification analyses were made on specimens collected in the summer pastures and the wildlife park. Individuals were dissected to examine signs of engorgement. The midguts that had visible traces of blood were isolated in 95% ethanol and stored at –20 °C. DNA was extracted using a commercial kit (NucleoSpin Tissue, Magerey-Nagel, Düren, Germany) on each individual midgut ground in 200 µL of PBS buffer.

Genomic DNA extracts from tabanid midguts were amplified by polymerase chain reaction (PCR) on a PTC-100 thermal cycler (MJ Research, Alameda, CA, USA) using specific primers.

Host primers based on cytochrome *b* (*cyt b*) were selected from Garros et al. (2011) for identifying wild boar, horse, cattle (or bison), sheep (or mouflon), goat, red deer, roe deer and izard (same primers as chamois).

Primers for horse and wild boar were used in simplex PCR-based assays with Univ1 and Univ3, respectively, as forward primers. Primers for domestic and wild ruminants were used in a multiplex PCR-based assay with Univ2 as the forward universal primer. To assess the sensitivity of the PCR assay in relation to blood-meal digestion, cattle and Univ2 primers were also used in a simplex PCR-based assay.

A 25 μ L reaction mixture was used, containing 12.5 μ L of 2 \times Type-it Multiplex PCR Master Mix (for multiplex PCR) or 12.5 μ L of TopTaq Master Mix (for simplex PCR), 0.5 μ L of each primer (10 μ M), 1 μ L of DNA and nuclease-free water (*quantum satis*). Both PCR kits were supplied by Qiagen, Valencia, CA, USA.

The PCR conditions in simplex assays were the same as those published by Garros et al. (2011), modified for the annealing temperature: 49 $^{\circ}$ C for cattle/Univ2, 50 $^{\circ}$ C for horse/Univ1 and 52 $^{\circ}$ C for wild boar/Univ3. In multiplex assays for Univ2, the PCR cycles were as follows: one cycle at 95 $^{\circ}$ C for 5 min, followed by 30 cycles at 95 $^{\circ}$ C for 30 s, 57 $^{\circ}$ C for 90 s, 72 $^{\circ}$ C for 30 s, and one cycle at 60 $^{\circ}$ C for 30 min.

The PCR products were subjected to electrophoresis on a 2% agarose gel stained with GelRed, including positive controls for each set of midguts tested. EDTA-blotted blood samples collected from wild and domestic animals were used as positive controls as in Garros et al. (2011).

To verify that red deer identifications in the wildlife park were not reindeer or fallow deer, PCR products were sent for sequencing with forward and reverse primers to Genoscreen, Lille, France. Sequences were edited with BioEdit 7.0.5.3 freeware (Hall, 1999) and run through the GenBank nucleotides, using BLASTN 2.2.25+ algorithm (Altschul et al., 1997).

2.3. Data analysis

In the wildlife park, host forage ratios (Hess et al., 1968) were used to determine if tabanids exhibited host biases. Forage ratios were obtained by dividing the percentage of a particular host species represented in tabanid blood meals by the percentage of that host in the general population of captive animals. Minimum flight distances of blood-fed female *T. bromius* were calculated using a map of the park at a scale of 1/4000 and were based on the location of traps and hosts.

3. Results

In the mountain pastures, a total of 2020 tabanids (including 1 male) belonging to 19 species were collected during eight 48-h trapping periods. In the wildlife park, a total of 1746 tabanids (including 3 males) belonging to 15 species were collected over a three-week trapping period. Of the female tabanids captured in the pastures, there were 49 specimens with visible traces of blood after dissection; of those captured in the wildlife park, there were 40 specimens with traces of blood. Of these, a total of 44 specimens collected in the pastures (90%) and 37 specimens collected in the wildlife park (93%) produced positive host identification in the species-specific PCR assays (Figs. 1 and 2). The

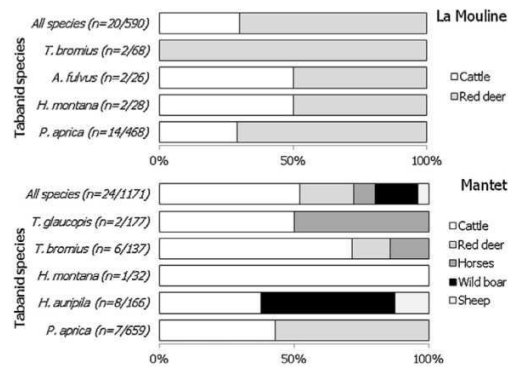


Fig. 1. Proportions of hosts identified from blood meals of different tabanid species in the pastures. Tabanids were collected with Nzi traps in the valleys of La Mouline and Mantet, eastern Pyrenees, France, between May and September 2011.

majority of the blood-fed specimens in the pastures were *Philipomyia aprica* (Meigen 1820) ($n = 21$), *Tabanus bromius* Linnaeus 1758 ($n = 8$) and *Hybomitra auripila* (Meigen 1820) ($n = 8$), whereas most of the blood-fed specimens in the wildlife park were *T. bromius* ($n = 32$).

In *T. bromius*, the mean (\pm SE) blood-meal size was 39.5 (\pm 8.1) mg after 24 h, 19.6 (\pm 1.8) mg after 48 h and 5.0 (\pm 1.4) mg after 72 h. There was no visible trace of blood in the midgut 144 h (6 days) after feeding, but females were full of eggs. No eggs were observed in unfed females.

A 1/10 dilution of the extracted DNA was sufficient for amplification (Fig. 3). All blood meals digested for 24, 48 and 72 h gave positive results (18/18) in simplex PCR assays with cattle and Univ2. In multiplex PCR assays, the number of blood meals that successfully amplified decreased to 6/6, 3/6 and 0/6 for meals digested for 24, 48 and 72 h. No DNA from blood meals digested for 6 days was amplified (0/6). Although the multiplex PCR appeared less sensitive than the simplex PCR, it was more convenient to use this method for screening blood meals taken from domestic and wild ruminants.

The molecular identification of the origin of blood meals in engorged tabanids collected in the mountain pastures is shown in Fig. 1. None of the females tested positive for goats, roe deer, izards or mouflons. In La Mouline, tabanids fed on red deer (70%) and cattle (30%). In Mantet, tabanids fed on cattle (52%), red deer (20%), wild boar (16%), horse (8%) and sheep (4%). One mixed blood meal was detected in a female *T. bromius* (cattle/horse).

In the park, *T. bromius* (90%) was the most abundant species collected (Fig. 2). A total of 32 specimens gave positive results for red deer ($n = 28$), bison ($n = 3$) and wild boar ($n = 2$), with one mixed blood meal (bison/wild boar). The forage ratios (FR) indicate a preference for red deer (FR = 3.3) and bison (FR = 2.3) (Table 2). All engorged females from other species tested positively only for red deer: *Hybomitra montana* (Meigen 1820) ($n = 1$), *Tabanus sudeticus* Zeller 1842 ($n = 2$) and *Haematopota pluvialis* (Linnaeus 1758) ($n = 2$). Ten positive PCR products for red deer were sequenced and confirmed the specificity

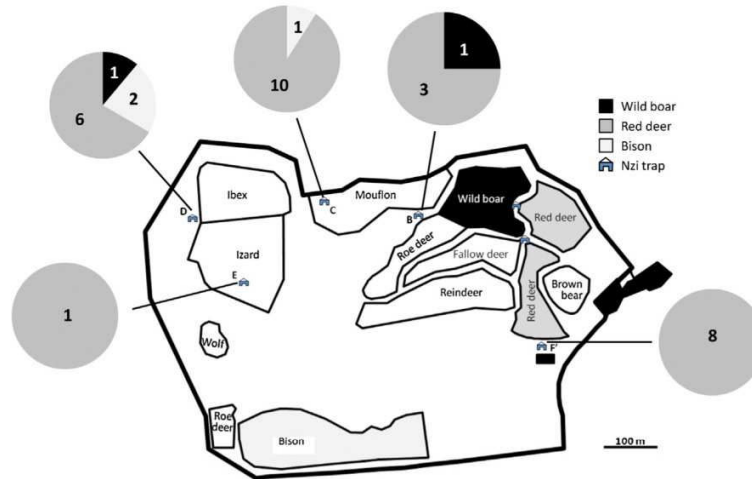


Fig. 2. Host identification from blood meals of *T. bromius* ($n = 32/1569$) in the Wildlife Park. Tabanids were collected with Nzi traps at different positions between 9 July and 1 August 2012.

of the DNA markers as none of these products were identified as reindeer or fallow deer.

The minimum flight distance between *T. bromius* and host locations was 291.1 ± 37.4 m (mean \pm standard error) with a maximum value of 600 m.

4. Discussion

Observations of the blood-meal size 24 h post-ingestion of *T. bromius* (~40 mg) were close to those in previous works on engorged medium-sized *Tabanus* species just after feeding, such as *T. mularis* (~57 mg), *T. subsimilis* (~65 mg), and *T. pallipennis* (~40 mg) (Hollander and Wright, 1980; Muzari et al., 2010b). Host DNA extracted from the blood meal 72 h post-ingestion still acted as an efficient template for PCR amplification. In one study, Muzari et al. (2010a) were able to identify horse blood antigens in tabanid specimens up to 6 days post-ingestion using an ELISA assay. They detected a high proportion of mixed blood meals (>20% of all detected meals), probably because the blood meals identified included residues from previous gonotrophic cycles. In our study, blood meals digested for 6 days could not be identified by PCR, and only two mixed (double feeding) blood meals (2.5% of all detected meals) were observed. These mixed blood meals corresponded to real host switching during a feeding

attempt, the consequence of interrupted feeding due to the host's defensive movements (Muzari et al., 2010b).

The proportion of blood-fed females collected (in both the pastures and the wildlife park) was relatively low (2.2%), but was consistent with previous studies. In Australia, 3.2% of the field specimens collected using Nzi traps had visible traces of blood (Muzari et al., 2010a). Nzi traps are visually attractive traps that more specifically catch female tabanids during their host-seeking flights.

In the La Mouline pasture, the estimated population of red deer was about 1.5 times lower than the cattle population. However, *P. aprica*, the most abundant tabanid collected in this valley, fed more on red deer than on cattle. Surprisingly, none of the tabanids collected here fed on small wild ungulates (izard and roe deer). In the Mantet pasture, none of the tabanids fed on small wild ungulates either, despite izard and roe deer densities being very high in this valley. Yet all the tabanid species took at least one blood meal on cattle. Three species were collected in sufficient numbers to describe their feeding pattern. The feeding patterns of *T. bromius* and *H. auripila* can be explained by host availability, considering the location and time of trapping. *H. auripila* was more abundant in the higher altitudes of the valley at the end of June, when cattle were at lower altitudes (Baldacchino et al., 2013). *T. bromius* was more abundant at lower and medium altitudes between mid-July and mid-August, when cattle were most

Table 2 Forage ratios of tabanids on ungulates in the Wildlife Park.

<i>T. bromius</i> ($n = 32/1569$)	Red deer	Bison	Wild boar	Roe deer	Izard	Mouflon
% Blood meals	85	9	6	0	0	0
% In park	26	4	12	5	19	34
Forage ratio	3.3	2.3	0.5	0	0	0

1 mixed blood meal (bison/wild boar).

Please cite this article in press as: Baldacchino, F., et al., Blood-feeding patterns of horse flies in the French Pyrenees. Vet. Parasitol. (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.10.009>

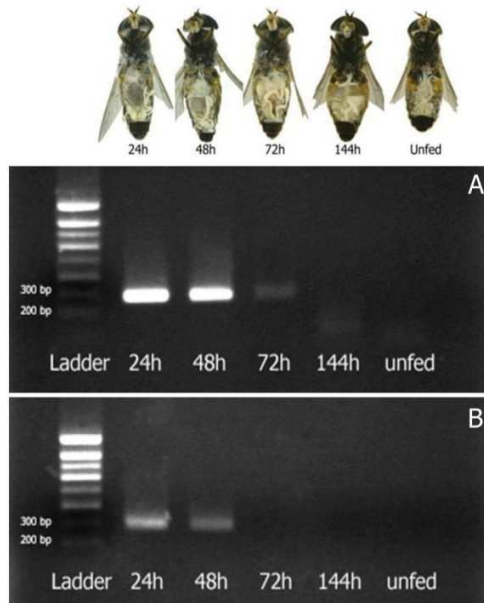


Fig. 3. Post-ingestion effects on PCR amplification. DNA products from blood meal of fully engorged *T. bromius* females extracted 24, 48, 72 and 144 h post-feeding were amplified by (A) simplex or (B) multiplex PCR-based assays.

present at medium and higher altitudes. For *P. aprica*, the prevalence of identified hosts is in contrast with the densities of cattle and red deer, yet this species was collected at the same altitudes as *T. bromius*. Therefore, *T. bromius* and *H. auripila* can be considered opportunistic feeders as mixed blood meals were also detected for *T. bromius*. The feeding pattern of *P. aprica* suggests a level of opportunistic feeding in addition to a preference for red deer.

Our survey in the wildlife park allowed us to compare the prevalence of blood meal sources with host densities, as well as to estimate the dispersal activity of horse flies. Similar studies have been made on mosquitoes in North American zoos and on biting midges in British zoos (Greenberg et al., 2012; Tuten et al., 2012; Vilar et al., 2011). In our survey of the wildlife park, no tabanids tested positively for small wild ungulates (izard, mouflon and roe deer), even when collections were done within or nearby the enclosures of these animals. These results match our findings in the pastures. However, all tabanid species tested positively for red deer, and *T. bromius*, the most abundant species, fed preferentially on large ungulates (red deer and bison).

There are two speculative explanations for this behaviour. The first is that large ungulates may be more attractive than small ones, presenting larger visual cues and releasing more chemical cues into the air, such as carbon dioxide and host odours (Gibson and Torr, 1999; Viennet et al., 2012). The second is that small ungulates may be more sensitive and thus more responsive to the biting of

tabanids. Previous studies on biting flies (tsetse and stable flies) indicate that they are more successful in feeding on older animals because of host size and because of younger animals' higher levels of defensive behaviour (Schofield and Torr, 2002; Torr et al., 2001).

The mean flight distance observed between a blood-fed *T. bromius* and a host was about 300 m. This flight dispersion is relatively large in comparison with mosquitoes containing fresh blood meals, which are mainly found within 40 m of their host (Ejiri et al., 2011). Horse flies are strong, fast fliers that can reach a mean daily flying distance of 1–2 km per day (Konstantinov, 1993).

Our findings are consistent with other studies showing that large mammals are preferential hosts for tabanids. In Connecticut, tabanids captured in woodlands and pastures fed preferentially on cattle (57%) and horses (14%) (Magnarelli and Anderson, 1980), and in Louisiana, tabanids collected in estuarine and alluvial areas also fed preferentially on cattle (63.2–74.1%) and horses (20.3–22.8%) (Wilson and Richards, 1969). In both studies, red deer are also hosts of most tabanid species (4–9.3%) and are considered of major importance in localities where cattle are absent. In our study, tabanids surprisingly fed equally on cattle (42.2%) and red deer (42.2%), particularly *P. aprica*, which in fact shows a preference for red deer. *P. aprica* is typical of hilly landscapes and is mainly encountered in mountainous regions (Chvála et al., 1972). So this species might be more linked to large wild hosts such as red deer.

The red deer has a large distribution in Europe, and over the last 50 years, red deer densities have considerably increased in France and in other European countries (Burbaité and Csányi, 2010). Increasing populations of red deer might help to maintain a high annual population of tabanids (Foil and Hogsette, 1994) by making it easier for females to locate a host and fulfil their nutritional and reproductive requirements, which could promote an intense pressure of horse flies on livestock and a higher transmission risk of bovine besnoitiosis. In addition, over the last few decades, forest areas, especially the distribution of *Pinus mugo*, have expanded into higher elevations in response to decreased grazing pressures and a warming climate (Heuertz et al., 2010). As it fragments open areas, forest expansion might also increase the abundance of tabanids in the future (Baldacchino et al., 2013).

Our results suggest that the most abundant tabanid species could potentially transmit bovine besnoitiosis in Pyrenean pastures and, more specifically, that *P. aprica* could act as a mechanical vector for *Besnoitia* sp. in red deer.

Acknowledgements

We would like to thank Charles Balaguer and the employees of Les Angles Wildlife Park, and Lucile Puech and Steve Manon of the National Veterinary School of Toulouse for their technical assistance in the field, as well as Florian Desoli of VetAgro Sup, Lyon, for his help in the PCR-based assays. We would also like to thank Claude Guisset of the Mantet Nature Reserve, Karine Geslot of the Jujols Nature Reserve, Alain Mangeot of the Nohêdes Nature Reserve and Olivier Galaup of the Departmental Hunting Federation

(Pyrénées-Orientales) for their invaluable help and useful input. We are also grateful to Patrick Guerin of the University of Neuchâtel for providing the polyethylene sachets, to Angèle Baldacchino for making the traps, and to the members of the UMR CMAEE, Cirad, for their generous welcome.

References

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J.H., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.
- Alvarez-García, G., Frey, C.F., Mora, L.M., Schares, G., 2013. A century of bovine besnoitiosis: an unknown disease re-emerging in Europe. *Trends Parasitol.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2013.06.002>.
- Baldacchino, F., Porciani, A., Bernard, C., Jay-Robert, P., 2013. Spatial and temporal distribution of Tabanidae in the Pyrenees Mountains: the influence of altitude and landscape structure. *Bull. Entomol. Res.*, <http://dx.doi.org/10.1017/S0007485313000254> (in press).
- Bigalke, R.D., 1968. New concepts on the epidemiological features of bovine besnoitiosis as determined by laboratory and field investigations. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 35, 3–137.
- Burbaité, L., Csányi, S., 2010. Red deer population and harvest changes in Europe. *Acta Zool. Lit.* 20, 179–188.
- Chvála, M., Lyneborg, L., Moucha, J., 1972. The Horse Flies of Europe (Diptera, Tabanidae). *Entomological Society of Copenhagen*, pp. 498.
- Desquesnes, M., Bîteau-Coroller, F., Bouyer, J., Dia, M.L., Foil, L., 2009. Development of a mathematical model for mechanical transmission of trypanosomes and other pathogens of cattle transmitted by tabanids. *Int. J. Parasitol.* 39, 333–346.
- Ejiri, H., Sato, Y., Kim, K.-S., Hara, T., Tsuda, Y., Imura, T., Murata, K., Yukawa, M., 2011. Entomological study on transmission of avian malaria parasites in a zoological garden in Japan: blood-meal identification and detection of avian malaria parasite DNA from blood-fed mosquitoes. *J. Med. Entomol.* 48, 600–607.
- Foil, L.D., Hogsette, J.A., 1994. Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies. *Rev. Sci. Tech. OIE* 13, 1125–1158.
- Garros, C., Gardès, L., Allène, X., Rakotoarivony, I., Viennet, E., Rossi, S., Balenghien, T., 2011. Adaptation of a species-specific multiplex PCR assay for the identification of blood meal source in *Culicoides* (Ceratopogonidae: Diptera): applications on Palaearctic biting midge species, vectors of orbiviruses. *Infect. Genet. Evol.* 11, 1103–1110.
- Gibson, G., Torr, S.J., 1999. Visual and olfactory responses of haematophagous Diptera to host stimuli. *Med. Vet. Entomol.* 13, 2–23.
- Gouteux, J.P., Noireau, F., Staak, C., 1989. The host preferences of *Chrysops silacea* and *Chrysops dimidiata* (Diptera, Tabanidae) in an endemic area of *Loa loa* in the Congo. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 83, 167–172.
- Greenberg, J.A., DiMenna, M.A., Hanelt, B., Hofkin, B.V., 2012. Analysis of post-blood meal flight distances in mosquitoes utilizing zoo animal blood meals. *J. Vector Ecol.* 37, 83–89.
- Gutiérrez-Expósito, D., Ortega-Moraa, L.M., Marcob, I., Boadellac, M., Gortázar, C., San Miguel-Ayanzd, J.M., García-Lunara, P., Lavínb, S., Álvarez-García, G., 2013. First serosurvey of *Besnoitia* spp. infection in wild European ruminants in Spain. *Vet. Parasitol.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.05.017> (in press).
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp.* 41, 95–98.
- Hess, A.D., Hayes, R.O., Tempelis, C.H., 1968. Use of forage ratio technique in mosquito host preferences studies. *Mosq. News* 28, 386–389.
- Heuert, M., Teufel, J., Gonzalez-Martinez, S.C., Soto, A., Fady, B., Alia, R., Vendramin, G.G., 2010. Geography determines genetic relationships between species of mountain pine (*Pinus mugo* complex) in western Europe. *J. Biogeogr.* 37, 541–556.
- Hollander, A.L., Wright, R.E., 1980. Impact of tabanids (Diptera: Tabanidae) on cattle: blood meal size and preferred feeding sites. *J. Econ. Entomol.* 73, 431–433.
- Jacquet, P., Lienard, E., Franc, M., 2010. Bovine besnoitiosis: epidemiological and clinical aspects. *Vet. Parasitol.* 174, 30–36.
- Konstantinov, S.A., 1993. The attack distance and the range and nature of the daily flight dispersion of horseflies in the genus *Hybomitra* (Diptera: Tabanidae). *Parazitologija* 2, 419–426.
- Magnarelli, L.A., Anderson, J.F., 1980. Feeding-behavior of Tabanidae (Diptera) on cattle and serological analysis of partial blood meals. *Environ. Entomol.* 9, 664–667.
- Mihok, S., 2002. The development of a multipurpose trap (the Nzi) for tsetse and other biting flies. *Bull. Entomol. Res.* 92, 385–403.
- Mukabana, W.R., Takken, W., Knols, B.G.J., 2002. Analysis of arthropod blood meals using molecular genetic markers. *Trends Parasitol.* 18, 505–509.
- Muzari, M.O., Burgess, G.W., Skerratt, L.F., Jones, R.E., Duran, T.L., 2010a. Host preferences of tabanid flies based on identification of blood meals by ELISA. *Vet. Parasitol.* 174, 191–198.
- Muzari, M.O., Skerratt, L.F., Jones, R.E., Duran, T.L., 2010b. Alighting and feeding behaviour of tabanid flies on horses, kangaroos and pigs. *Vet. Parasitol.* 170, 104–111.
- Schofield, S., Torr, S.J., 2002. A comparison of the feeding behaviour of tsetse and stable flies. *Med. Vet. Entomol.* 16, 177–185.
- Torr, S.J., Hall, D.R., Phelps, R.J., Vale, G.A., 1997. Methods for dispensing odour attractants for tsetse flies (Diptera: Glossinidae). *Bull. Entomol. Res.* 87, 299–311.
- Torr, S.J., Wilson, P.J., Schofield, S., Mangwiro, T.N.C., Akber, S., White, B.N., 2001. Application of DNA markers to identify the individual-specific hosts of tsetse feeding on cattle. *Med. Vet. Entomol.* 15, 78–86.
- Tuten, H.C., Bridges, W.C., Paul, K.S., Adler, P.H., 2012. Blood-feeding ecology of mosquitoes in zoos. *Med. Vet. Entomol.* 26, 407–416.
- Viennet, E., Garros, C., Gardès, L., Rakotoarivony, I., Allène, X., Lancelot, R., Crochet, D., Moulia, C., Baldet, T., Balenghien, T., 2012. Host preferences of Palaearctic *Culicoides* biting midges: implications for transmission of orbiviruses. *Med. Vet. Entomol.* 27, 255–266.
- Vilar, M.J., Guis, H., Krzywinski, J., Sanderson, S., Baylis, M., 2011. *Culicoides* vectors of bluetongue virus in Chester Zoo. *Vet. Rec.* 168, 242.
- Wilson, B.H., Richards, C.G., 1969. Tabanid hosts in estuarine and alluvial areas of Louisiana. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 62, 1043–1046.

Please cite this article in press as: Baldacchino, F., et al., Blood-feeding patterns of horse flies in the French Pyrenees. *Vet. Parasitol.* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.10.009>

2.4. Conclusion chapitre

Ces différents travaux sur l'écologie des taons donnent une image plus précise de l'activité de ces ectoparasites dans les estives de haute-montagne :

- i) L'exposition, l'altitude et la structure paysagère influencent la distribution spatio-temporelle des femelles adultes qui sont plus abondantes dans les zones fragmentées forêts – milieux ouverts et moins abondantes en altitude (à l'exception des espèces de montagne). La période d'activité s'étend de juillet à août (plus courte dans les estives exposées au sud) avec une succession d'espèces au cours de l'été. Les principales espèces ont un seul pic d'activité journalier, entre 11h et 13h (GMT+1).
- ii) Les conditions climatiques et l'altitude influencent l'activité de piqûre des femelles. Des températures élevées, une vitesse de vent faible et une humidité relative basse sont globalement favorables aux attaques de taons. L'altitude, qui modifie aussi les conditions climatiques, est associée négativement au nombre de piqûres. Les pattes des bovins sont les régions du corps les plus piquées, ce qui explique pourquoi, en réaction, les coups de pattes sont positivement corrélés aux attaques de taons.
- iii) Les femelles taons ont un comportement trophique plutôt opportuniste en estive, le cerf constituant un hôte préférentiel dans ce type d'environnement. En revanche, aucun repas de sang sur petits ruminants sauvages n'a été détecté.

Les implications de ces études sont nombreuses concernant l'abondance des populations de taons, la transmission de la besnoitiose bovine, la surveillance et la lutte contre ces insectes :

- i) L'évolution actuelle des paysages en montagne et des densités de cerfs sont propices à la prolifération des taons dans les années à venir. D'une part, la fragmentation des milieux ouverts, due à l'expansion des forêts, crée des habitats favorables aux taons. D'autre part, l'augmentation du taux d'occupation du cerf élaphe dans les forêts d'altitude facilite l'obtention d'une source de sang pour les femelles.
- ii) Toutes les espèces de taons collectées en estives se nourrissent sur bovins et leur abondance est donc favorable à la diffusion de la besnoitiose bovine. Le rôle des cerfs comme réservoir de *Besnoitia besnoiti* reste mal connu. Toutefois, le comportement

trophique des taons apparaît aussi favorable à la transmission de *Besnoitia* sp. chez les cerfs.

- iii) L'observation des réactions de défense a montré que les coups de pattes pouvaient être un assez bon indicateur de la nuisance due aux taons (plus de 10 coups de pattes/min → au moins 2 attaques de taons/vache/min). Le comptage des réactions de défense est une méthode simple et pratique pour évaluer la nuisance des animaux dans le cadre d'une surveillance ou d'un protocole de lutte.
- iv) Le contrôle des populations de taons et la protection des troupeaux peuvent passer par l'usage de différentes méthodes (cf. chapitre 4). Lors d'une lutte chimique, il faut s'assurer que le produit utilisé diffuse et demeure suffisamment actif dans les régions basses du corps, les plus piquées (pattes et mamelles). En estive, la protection des bovins peut se faire en privilégiant des zones de pâturage éloignées des lisières et en altitude. Cependant, un troupeau constitue un groupe d'hôtes très attractifs pour les taons qui ont la capacité de vol suffisante pour le localiser. La lutte contre les femelles adultes doit être concentrée en été, les jours où les conditions climatiques sont les plus favorables (températures élevées, vitesse du vent et humidité faibles).

Chapitre 3: Tabanidae et odeurs d'hôtes

Pour communiquer, les mammifères utilisent des signaux chimiques qui résultent de leur métabolisme et se retrouvent dans les produits d'excrétions, les sécrétions glandulaires et les exsudations (Madubunyi *et al.* 1996). Les diptères hématophages interceptent ces molécules volatiles pour localiser leurs hôtes. Ces molécules sémiochimiques sont donc des kairomones c'est-à-dire qu'elles sont produites par une espèce dite émettrice, qu'elles interagissent avec une autre espèce dite réceptrice et que cette interaction bénéficie à l'espèce réceptrice et non à l'espèce émettrice (Ruther *et al.* 2002). Une meilleure compréhension de l'implication des kairomones dans la localisation des hôtes est nécessaire, en particulier pour améliorer l'efficacité des appâts ajoutés aux pièges dans les programmes de surveillance ou de lutte contre les insectes (Takken & Knols 2010).

Chez les Tabanidae, l'attractivité de différentes odeurs d'hôtes a été étudiée sur le terrain grâce à des protocoles de piégeage. L'octénol, certains phénols et les urines d'ongulés sont des substances attractives pour les taons, mais les résultats peuvent être très variables d'une étude à l'autre. La physiologie sensorielle des taons reste un champ inexploré, probablement à cause de l'absence de colonies de laboratoire. Seuls Stoffolano *et al.* (1990) ont enregistré des réponses physiologiques chez *T. nigrovittatus* après stimulation des récepteurs gustatifs situés sur les tarsi. Nous proposons ainsi d'étudier la sensibilité olfactive de deux espèces de taons (*T. bromius* et *A. quadrifarius*) à travers (i) l'enregistrement des réponses physiologiques antennaires consécutives à des stimuli olfactifs via l'électroantennographie (EAG) (**Encart 3**), et (ii) la comparaison des collectes réalisées sur le terrain en utilisant des pièges attractifs visuels complétés, ou non, par différents attractifs olfactifs potentiels.

Le premier article (Article 4), publié dans *Medical and Veterinary Entomology*, compare l'activité de différentes urines d'ongulés sur les récepteurs olfactifs des antennes des deux espèces de taons ainsi que l'attractivité de ces urines sur le terrain. Ce travail a permis de valider la technique d'EAG que nous avons mise au point pour les taons.

Encart 3 : Électroantennographie (EAG)

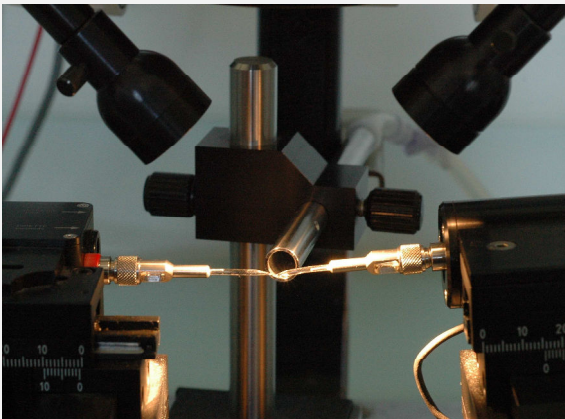


Figure A. Montage EAG avec l'antenne disposée entre l'électrode de référence et l'électrode d'enregistrement. Le tube en métal permet de maintenir sur l'antenne un flux d'air humidifié et filtré sur charbon actif. (F. Baldacchino, 2013)



Figure B. Zoom sur l'antenne d'une femelle *T. bromius* (F. Baldacchino, 2011)

L'électroantennographie est une approche simple pour étudier les réponses des récepteurs cellulaires des antennes d'insectes à des stimuli olfactifs (Jeanbourquin 2005). L'électroantennogramme représente un dérivé des potentiels des récepteurs de plusieurs cellules réceptrices olfactives activés par un stimulus donné et enregistrés plus ou moins simultanément par une électrode au contact de l'épithélium sensoriel. Une odeur donnée entraîne une dépolarisation négative rapide suivie d'une repolarisation plus lente à la fin du stimulus (Schneider 1969; Roelofs 1984). L'amplitude d'une réponse EAG augmente à doses croissantes jusqu'à saturation. Les doses des stimuli testées en EAG doivent être cohérentes avec la physiologie des insectes utilisés (Bruce *et al.* 2005).

Cette technique est basée sur les travaux de Schneider (1957) qui enregistra des petites fluctuations de voltage entre la base et la pointe d'une antenne de bombyx du mûrier (*B. mori*) stimulée par des phéromones. L'EAG a été utilisée chez les glossines (Hall *et al.* 1984; Den Otter *et al.* 1988) et chez les stomoxes (Schofield *et al.* 1995; Jeanbourquin & Guerin 2007) afin d'identifier, parmi les odeurs d'hôtes, les molécules actives sur les récepteurs cellulaires des antennes.

Les enregistrements peuvent se faire sur l'antenne seule, sur l'antenne avec la tête ou sur l'antenne avec l'insecte entier. Dans nos travaux, nous avons privilégié le montage de l'antenne seule entre les deux électrodes, ce qui permettait d'avoir un meilleur signal par rapport au montage de l'antenne avec la tête.

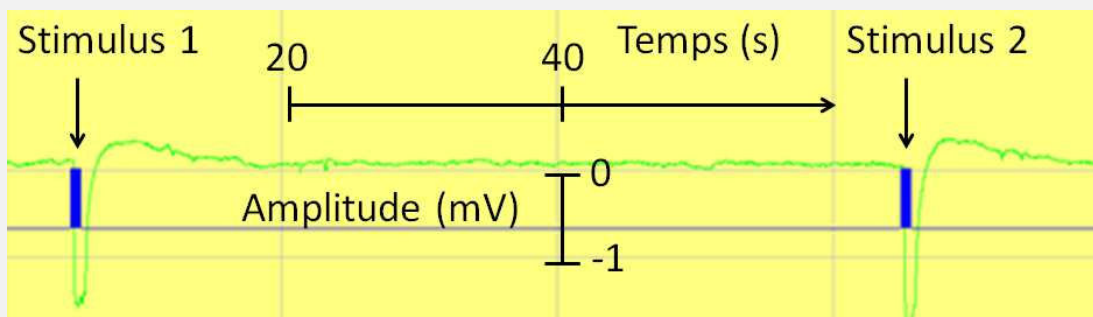


Figure C. Enregistrement d'un électroantennogramme sur antenne de *T. bromius*. L'intervalle minimum entre les stimuli étaient de 60s afin d'éviter une saturation des récepteurs cellulaires.

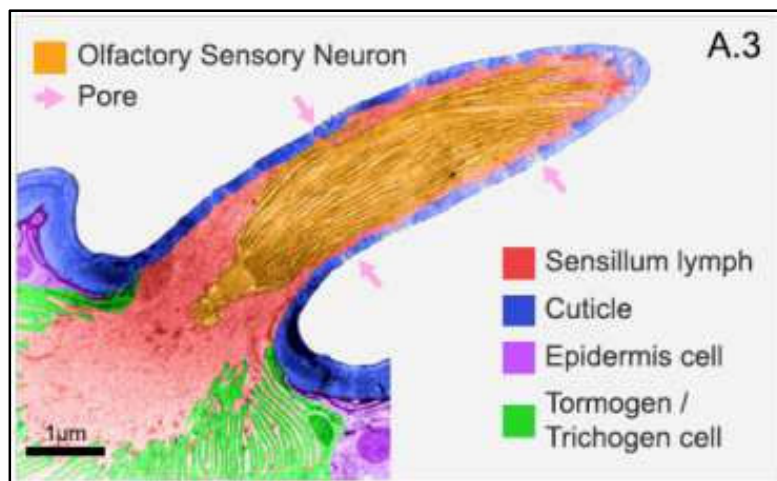
Le deuxième article (Article 5), publié dans *Medical and Veterinary Entomology*, met en évidence les réponses physiologiques et comportementales des taons vis-à-vis de l'octénol, des phénols et de l'urine de cheval. Il apporte un regard neuf sur les interactions entre kairomones et les différences interspécifiques chez les Tabanidae.

3.1. Système olfactif chez les Tabanidae

3.1.1. Organisation du système olfactif périphérique chez les insectes

Le système olfactif périphérique constitue le nez des insectes (de Bruyne & Baker 2008). Pour qu'un insecte puisse répondre à son environnement par des comportements appropriés, son système olfactif doit :

- Fournir une information rapide et fiable à propos de signaux spécifiques qui induisent des comportements innés.
- Capturer les caractéristiques essentielles d'un large éventail d'odeurs qui peuvent être mémorisées et qui peuvent guider des comportements adaptatifs.



Les neurones olfactifs ORN (Olfactory Receptor Neurons) ou OSN (Olfactory Sensory Neurons) sont les détecteurs d'odeurs qui vont limiter la capacité olfactive des insectes. L'étendue et la précision avec lesquelles les odeurs peuvent être identifiées dépend du nombre de ces détecteurs et de leur sensibilité vis-à-vis des différents composés chimiques. Les ORN sont des neurones bipolaires qui se développent à partir de cellules épithéliales. Ces cellules forment des petites structures cuticulaires, les sensilles, chaque ORN se prolongeant à l'intérieur d'une sensille olfactive (Figure 16). Les pores à travers la cuticule de la sensille permettent aux molécules odorantes de passer et de se dissoudre dans la lymphe (Hansson & Stensmyr, 2011). La majorité des sensilles olfactives est sur les antennes, mais une petite partie est sur les palpes labiaux ou maxillaires. Par exemple, chez la drosophile, il y a 1200 neurones olfactifs sur le 3^{ème} segment de l'antenne et 120 neurones olfactifs sur les palpes maxillaires (Jefferis 2005).

3.1.2. Fonctionnement du système olfactif

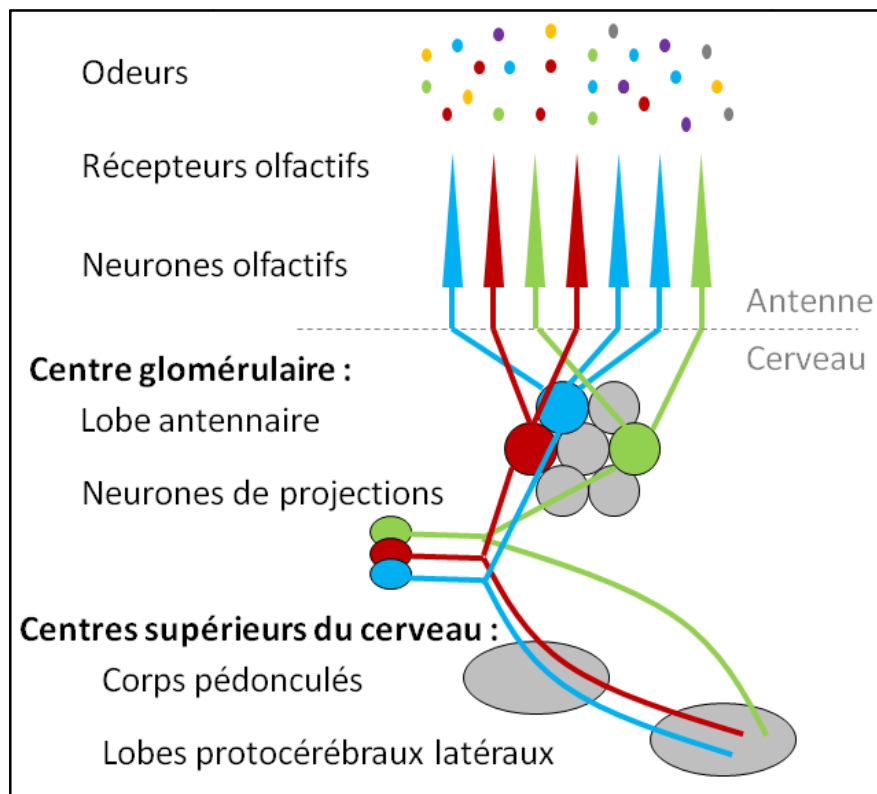


Figure 17. Anatomie du système olfactif chez les insectes (d'après Ramdya & Benton 2010)

Les différentes odeurs sont captées par des récepteurs olfactifs ORs (Odorant Receptors) spécifiques situés dans les dendrites des neurones olfactifs (Ramdya & Benton 2010) (Figure 17). La grande majorité des neurones olfactifs ne possède qu'un seul type d'OR et ils sont donc sensibles à une gamme étroite de molécules. Les axones des neurones olfactifs qui possèdent un même OR convergent vers un ou plusieurs glomérules de même type à l'intérieur du lobe antennaire. De là, les neurones de projection transmettent l'information olfactive aux centres supérieurs du cerveau qui sont les corps pédonculés et les lobes protocérébraux latéraux. Par conséquent, le système périphérique transforme l'identité et l'intensité d'une odeur en un « code » glomérulaire unique avec sa composante spatio-temporelle.

3.1.3. Caractéristiques des antennes de Tabanidae

Les antennes de Tabanidae ont des caractéristiques variables selon les genres et les espèces, (Figure 18). L'antenne est divisée en 3 parties : le scape (=1^{er} segment), le pédicelle (2^{ème} segment) et le flagelle (à partir du 3^{ème} segment) (Chvála *et al.* 1972). Contrairement au scape et au pédicelle, le flagelle est segmenté avec un segment basal plus grand.

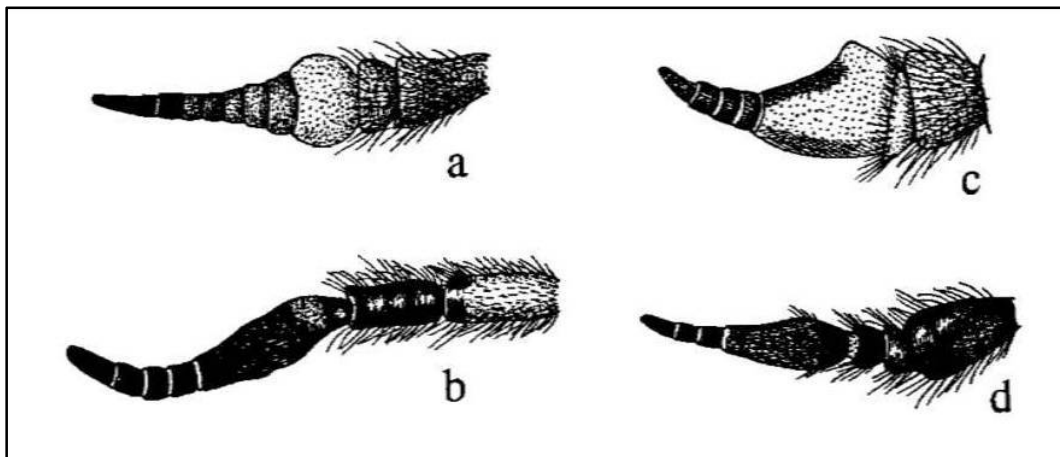


Figure 18. Antennes de Tabanidae (in Chvála *et al.* 1972)
a. *P. micans*, b. *C. viduatus*, c. *H. distinguenda*, d. *H. pluvialis*

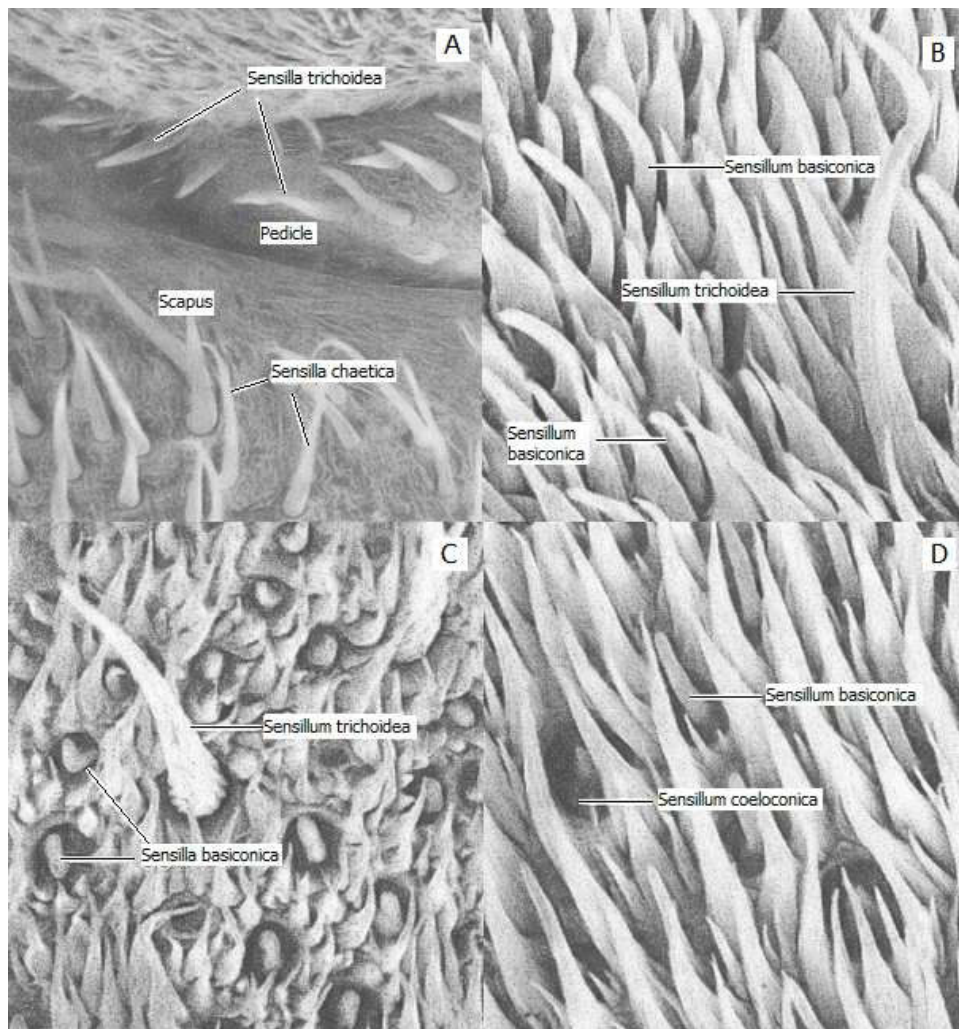


Figure 19. Sensilles des antennes de *H. bimaculata* (in Ivanov 2007)

- (A) Sensilles chétiformes et trichoïdes sur le scape et le pédicelle (x240)
- (B) Sensilles basiconiques et trichoïdes sur le 3^{ème} segment (x1800)
- (C) Sensilles basiconiques et trichoïdes sur le 3^{ème} segment (x910)
- (D) Sensilles basiconiques et cœloconique sur le 4^{ème} segment (x1250)

Il existe plusieurs types morphologiques de sensilles réparties différemment sur les segments de l'antenne. Cette répartition spatiale est assez semblable chez les différentes espèces (Ivanov 2007) (Figure 19). Les sensilles chétiformes (sensilla chaetica) sans pores sont surtout réparties sur le scape et le pédicelle. Elles jouent le rôle de mécanorécepteurs. Les sensilles olfactives trichoïdes (sensilla trichoidea) et basiconiques (sensilla basiconica) sont principalement situées sur le flagelle, de même que les sensilles cœloconiques (sensilla coeloconica) supposées avoir une fonction hygro/thermo-réceptive. Parashar *et al.* (1994) ont suggéré que la sensibilité

olfactive des différentes espèces de taons dépend étroitement du nombre de sensilles olfactives présentes sur les antennes.

3.2. Rôle des kairomones dans la localisation des hôtes vertébrés

3.2.1. Principaux composés impliqués

Plusieurs composés chimiques ont été identifiés comme des attractifs chez les taons. Les tableaux des annexes 4 et 5 synthétisent les principales données disponibles à ce-jour sur le CO₂ et les autres kairomones. Le CO₂, présent dans la respiration des vertébrés, est un attractif universel pour tous les diptères hématophages. Les autres composés attractifs pour les taons sont l'octénol et certains phénols (Gibson & Torr 1999). En revanche, les cétones (e.g. acétone) ne sont pas des molécules attractives.

Ces composés sont naturellement produits par le métabolisme des mammifères et ils sont ainsi présents dans les émissions volatiles issues de la respiration, des éructations, de la transpiration, des fèces ou encore des urines (Hall *et al.* 1984; Owaga *et al.* 1988; Madubunyi *et al.* 1996; Jeanbourquin & Guerin 2007; Harraca *et al.* 2009; Dormont *et al.* 2010).

Les urines d'ongulés ont un très fort pouvoir attractif sur les femelles de taons adultes. Des expériences réalisées avec des pièges Canopy en Croatie ont montré de très fortes augmentations de collectes avec de l'urine de cheval pour différentes espèces (*A. loewianus*, *H. pluvialis*, *T. bromius*) (Krčmar *et al.* 2006). Au Canada, une expérience conduite avec des pièges Nzi et de l'urine de vache a mis en évidence une bonne attractivité pour *Hybomitra* spp. (x 1,8) mais pas pour *Tabanus* spp. (Mihok & Mulye 2010).

L'attractivité de l'urine des ongulés pour les taons reste mal expliquée. Mihok et Lange (2012) ont démontré un effet synergique entre l'ammoniaque et les phénols présents dans les urines. Mais d'autres composés pourraient aussi être impliqués dans le comportement de recherche d'hôtes par les femelles.

L'octénol est un attractif efficace chez de nombreux insectes hématophages notamment les glossines et les stomoxes (Hall *et al.* 1984; Schofield & Brady 1997). Chez les taons, plusieurs études ont montré son efficacité sur le terrain. L'ajout d'octénol permet de multiplier les collectes par un facteur compris entre 2 et 9 selon les études (Mihok & Mulye 2010). Le taux de diffusion de l'octénol dans l'air ne semble pas affecter les collectes.

Les phénols sont très présents dans les urines d'ongulés, en particulier le 4-méthylphénol (4MP) ou p-crésol (Okech & Hassanali 1990). Ces phénols se forment progressivement dans les urines à partir de la dégradation microbienne de composés précurseurs (glucuronates et sulfates). Ainsi, l'urine « vieillie » pendant deux à trois semaines sera beaucoup plus attractive que l'urine « fraîche ».

Le 4MP et le 3-*n*-propylphénol (3PP) sont les phénols qui ont été le plus souvent testés chez les taons. Owaga *et al.* (1988) ont démontré qu'ils étaient responsables de l'attractivité de l'urine de buffle pour les glossines. Ces deux phénols sont classiquement utilisés en mélange avec l'octénol. Au Zimbabwe, une formulation octénol+4MP+3PP (4:8:1) a augmenté nettement (jusqu'à 10 fois) les collectes de *Tabanus* sp. (Phelps & Holloway 1992). Cependant, la même formulation testée en Louisiane (USA) s'est révélée moins efficace, le nombre de *Tabanus* sp. capturés ayant seulement doublé du fait de la présence de l'octénol.

Finalement, peu de composés ont été testés chez les taons et les observations peuvent être très contrastées d'une étude à l'autre. L'absence de protocole standardisé rend difficile la comparaison des résultats obtenus pour différentes espèces, dans différentes régions. En outre, la lourdeur des expérimentations de terrain est un frein à la généralisation des tests.

3.2.2. Contraintes liées à l'expérimentation sur le terrain

Toutes les études sur les attractifs des taons sont basées sur des comparaisons de collectes sur le terrain. Les résultats observés sont ainsi très variables selon le dispositif expérimental mis en œuvre (pièges, mode de diffusion des odeurs...), les conditions environnementales lors des tests (variables météorologiques, présence d'animaux à proximité des pièges...) et les espèces de taons présentes.

Les deux principaux pièges qui ont été utilisés pour les taons sont les pièges Canopy (Hribar *et al.* 1991) et les pièges Nzi (Mihok 2002). Or, les collectes avec les pièges Canopy sont beaucoup plus affectées par l'ajout d'un attractif odorant que celles avec les pièges Nzi (Mihok & Mulye 2010). En effet, un piège Canopy sans attractif capture beaucoup moins de taons qu'un piège Nzi qui est visuellement très attractif. L'efficacité réelle (nombre d'insectes capturés par rapport au nombre d'insectes attirés) d'un piège Nzi est de l'ordre de 45% pour *T. suffis*, *T. taeniola* et *A. agrestis* en Afrique (Mohamed-Ahmed *et al.* 2007). Bien que cette efficacité n'ait jamais été réellement mesurée pour des espèces tempérées, ce piège s'est révélé très efficace dans la collecte des taons en Amérique du Nord. Par exemple, plus de 400 *H. epistates* ont été collectés en moyenne au Canada par piège et par jour (Mihok & Lange 2012).

Différents dispositifs ont été testés pour la diffusion des odeurs. Pour les urines, l'ammoniaque ou l'acétone, l'usage de récipients plastiques avec des ouvertures de différents diamètres permet de faire varier le taux d'évaporation. Pour l'octénol et les phénols, l'utilisation de sachets en polyéthylène (50 cm² de surface et 0,15 mm d'épaisseur) permet une diffusion durable et connue d'après les estimations de Torr *et al.* (1997). Le taux de diffusion de l'octénol à partir de ces sachets est environ 6 fois celui d'un bœuf (0,02 mg/h) (Torr *et al.* 1995). Des taux de diffusion bien supérieurs (40 mg/h) ont été testés avec de l'octénol dans des flacons surmontés d'une mèche en coton (French & Kline 1989; Nilssen 1998). Des dispositifs commerciaux sont également disponibles pour l'octénol comme le Dragonfly® lure (Bosensory, Willimantic, CT, USA) ou le Mosquito Magnet® octenol cartridge (American Biophysics, East Greenwich, RI, USA). Mais, aucun effet dose-réponse de l'octénol n'a été détecté sur les collectes de taons lors de tests avec des sachets en polyéthylène (0,13 mg/h) et des appâts Dragonfly (1,5 mg/h) (Mihok & Mulye 2010).

Les conditions climatiques peuvent également fortement influencer les collectes, notamment le vent qui perturbe les signaux olfactifs captés par les antennes des taons. En effet, les diptères détectent et répondent aux changements de fréquence des bouffées d'odeurs ainsi qu'à la concentration relative des composés volatils présents dans ces bouffées (Gibson & Torr 1999). L'augmentation des turbulences perturbe la circulation des bouffées d'odeurs, ce qui entraîne une dilution des odeurs et donc une diminution de la force du signal odorant.

Enfin, la présence d'animaux peut affecter les expérimentations sur le terrain comme cela a pu être observé chez les stomoxes au Kenya (Mihok *et al.* 1995). Des pièges Vavoua avec de l'octénol, installés à proximité d'un troupeau, ne collectaient pas davantage de stomoxes que les pièges sans octénol. En revanche, l'ajout d'octénol s'est montré réellement efficace dans le parc national voisin. Nous avons rencontré le même problème lors d'une expérimentation avec des pièges Nzi et des urines d'ongulés domestiques. Les pièges ont été installés dans une pâture de vaches camarguaises qui se déplaçaient peu. Le piège le plus proche des vaches a attiré beaucoup plus de taons que les autres pièges.

3.2.3. Comparaisons des odeurs d'ongulés domestiques : exemple des urines

Article 4 : Behavioural and electrophysiological responses of females of two species of tabanid to volatiles in urine of different mammals.

F. Baldacchino, J. Cadier, A. Porciani, B. Buatois, L. Dormont & P. Jay-Robert.

Medical and Veterinary Entomology, 27, 77-85. 2012

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2915.2012.01022.x/abstract>

Résumé

Pour mieux comprendre la dépendance des taons vis-à-vis de leurs différents hôtes potentiels, il nous a semblé opportun d'étudier l'effet de kairomones hautement spécifiques. Nous avons donc étudié la sensibilité des taons aux odeurs d'urines des trois principaux ongulés domestiques que sont la vache, le cheval et la brebis. L'effet de ces trois urines sur les femelles a été évalué conjointement au niveau physiologique (sensibilité antennaire) et comportemental (attractivité réelle). L'attractivité en conditions naturelles a été testée selon la méthode du carré latin avec 4 pièges Nzi (3 avec urine et 1 sans urine).

L'expérience a été menée sur le site de « Peau de Meau » dans la réserve naturelle des Coussouls de Crau (Figure 20). Ce site est un site de choix car :

- On y trouve au printemps d'importantes populations de deux Tabanini : *T. bromius* et *A. quadrifarius* (probablement en lien avec la présence de canaux d'irrigation).
- La Crau sèche est une steppe très vaste et très homogène sans végétation haute. Ainsi, la visibilité des pièges Nzi n'est pas perturbée et les bouffées d'odeurs se déplacent dans l'air sans obstacles.
- Cette zone est exclusivement pâturée par des ovins depuis plusieurs siècles. Il ne peut donc pas y avoir d'interférence entre les pièges et la présence de grands ongulés. Un troupeau de vaches camarguaises et quelques chevaux sont présents dans une pâture située à environ 1 km.



Figure 20. Piège Nzi sur le site de « Peau de Meau »(F. Baldacchino, 2011)

Les réponses physiologiques des antennes ont été enregistrées par EAG. Les tests ont été effectués sur des femelles collectées sur le terrain et maintenues en vie au laboratoire avec de l'eau sucrée disponible *ad libitum* sur des éponges fines.

Afin de valider le montage de l'antenne et le protocole EAG, nous avons mesuré l'activité de l'octénol à différentes concentrations et du dichlorométhane (DCM). L'octénol est un attractif commun aux diptères hématophages. Son activité sur les récepteurs cellulaires des antennes de glossines et de stomoxes a déjà été testée avec succès (Den Otter *et al.* 1988; Schofield *et al.* 1995). Le DCM est un solvant inerte qui est communément utilisé en écologie chimique.

L'augmentation de la concentration de l'octénol a entraîné pour *T. bromius* comme pour *A. quadrifarius* des réponses antennaires d'amplitudes croissantes mais les réponses enregistrées pour *A. quadrifarius* sont demeurées très faibles. Pour le DCM, les réponses EAG n'étaient pas significativement différentes des réponses obtenues en l'absence d'odeur (enregistrement des réponses des mécanorécepteurs uniquement). Le protocole a donc été validé avec utilisation de l'octénol à 0,1 mg/μL comme témoin positif et du DCM pur comme témoin négatif.

Les urines d'ongulés domestiques ont subi une extraction au solvant DCM. Les réponses antennaires enregistrées avec les extraits d'urines sont les suivantes :

- Pour *T. bromius*, aucune différence significative n'a été observée entre l'octénol à 0,1 mg/μL et les urines ;
- Pour *A. quadrifarius*, l'octénol n'a déclenché que des réponses faibles toujours significativement inférieures à celles déclenchées par les urines ;
- Pour les deux espèces, les urines de vache et de cheval ont déclenchées des réponses significativement supérieures aux réponses obtenues avec l'urine de brebis.

D'un point de vue physiologique, il existe donc une différence entre les réponses des récepteurs cellulaires des deux espèces, *A. quadrifarius* étant très peu sensible à l'octénol. Par ailleurs, les réponses enregistrées pour les urines sont cohérentes avec la biologie des femelles qui préfèrent se gorger sur des mammifères de grande taille (vache, cheval). Les différences observées pour les réponses EAG aux urines sont liées à la composition des urines qui varie en fonction de l'espèce, mais aussi en fonction de l'âge, du stade physiologique... (Torr *et al.* 2006).

L'étude conduite en Crau a permis d'évaluer les implications comportementales de ces différences de sensibilité. La comparaison des collectes de *T. bromius* et d'*A. quadrifarius* dans les différents pièges montrent que les pièges avec urine capturent plus de taons que les pièges

sans urine. Les différences ne sont pas toujours statistiquement significatives, mais ceci peut s'expliquer par le nombre limité de répétitions. La présence d'urine de cheval, en particulier, augmente les captures de *T. bromius* d'un facteur de 1,6 et celles d'*A. quadrifarius* d'un facteur de 3,5. Aucune différence significative n'a été observée entre les trois urines, contrairement aux réponses EAG.

Notre travail nous a donc permis de valider un protocole expérimental d'électroantennographie pour les taons. Les résultats suggèrent une différence de sensibilité olfactive entre les deux espèces étudiées, *T. bromius* et *A. quadrifarius*. Des deux espèces, *A. quadrifarius* est à la fois celle dont les captures sur le terrain ont été le plus fortement augmentées par l'utilisation d'urine (x 1,7 à 3,5) et celle qui présente la plus forte sensibilité antennaire lorsque l'on compare l'effet de ces mêmes urines à celle de l'octénol considéré comme un stimulant de référence. Ainsi, les différentes espèces de taons semblent présenter une plus ou moins grande sensibilité vis-à-vis des odeurs de leur environnement et, en particulier, vis-à-vis des kairomones de leurs hôtes potentiels. Ce résultat mériterait d'être confirmé car il implique que les capacités de localisation des hôtes par les différentes espèces ne reposent pas forcément sur une même combinaison des signaux olfactifs et visuels.

Toutefois, l'interprétation des réponses EAG pour des mélanges est souvent délicate à cause des interactions qui existent entre les molécules (Laing & Francis 1989). Les phénols étant considérés comme les molécules responsables de l'attractivité des urines, il est apparu nécessaire de tester leur activité sur les récepteurs olfactifs et leur attractivité sur le terrain (Article 5).

Article 4 : Behavioural and electrophysiological responses of females of two species of tabanid to volatiles in urine of different mammals.

F. Baldacchino, J. Cadier, A. Porciani, B. Buatois, L.Dormont & P. Jay-Robert.

Medical and Veterinary Entomology, 27, 77-85. 2012

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2915.2012.01022.x/abstract>

Behavioural and electrophysiological responses of females of two species of tabanids to urine volatiles from different mammals

F. BALDACCHINO^{1,2}, J. CADIER¹, A. PORCIANI¹, B. BUATOIS², L. DORMONT^{2,1} and P. JAY-ROBERT^{1,2}

¹Université Paul-Valéry, CNRS-UMR 5175, Montpellier, France

²Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive (CEFE), CNRS-UMR 5175, Montpellier, France

Abstract. Urine volatiles from different ungulates (cows, horses and sheep) were tested as bait for tabanids in southeastern France using Nzi traps during the early summer of 2011. *Tabanus bromius* Linnaeus, 1758 and *Atylotus quadrifarius* (Loew, 1874) (Diptera: Tabanidae) were the most captured species, corresponding respectively to 57% and 41% of the total collected tabanids (which were all female). Horse urine significantly increased catches of *T. bromius* and catches of *A. quadrifarius* (1.6-fold and 3.5-fold respectively), and sheep urine significantly increased catches of *A. quadrifarius* (2.5-fold). In parallel, an electroantennogram study was conducted for the first time on these two species, with EAGs recorded using 1-octen-3-ol and extracts of the same urine samples used in the field. For *T. bromius*, the EAG response to 1-octen-3-ol increased quasi-sigmoidally with dose, with a maximum response at or above 100 µg on filter paper. For both species of tabanids, cow and horse urine elicited stronger EAGs than did sheep urine. The behavioural implications in host-seeking and feeding habits are discussed.

Key words. Tabanidae, baits, Nzi trap, electroantennography, octenol, urine, olfaction, host odours.

Introduction

In their quest for locating important resources such as mates, nutrients and oviposition and resting sites, insects rely on their olfaction to a large extent. Though olfaction has been studied in many insect species, comprehensive data comes mainly from a few groups such as cockroaches, moths, vinegar flies, honeybees and mosquitoes (de Bruyne & Baker, 2008). In haematophagous Diptera, odours are one of the principle external cues affecting host-seeking and feeding behaviour. Olfactory mechanisms have been well characterized in mosquitoes, which are important vectors of human diseases such as yellow fever, dengue and malaria (Zwiebel & Takken, 2004), but other biting insects such as tabanids, which are vectors of principally veterinary importance, have received less study.

Horse flies (Diptera: Tabanidae) are large diurnal haematophagous insects (10–30 mm). The females feed on large mammals such as cattle, horses and deer. Horse flies are strong fliers, which enables them to seek wild and domestic mammals scattered around the environment and to avoid defensive behaviour from the host. They are a serious nuisance to livestock and can

transmit several significant animal pathogens (for example, surra, anaplasmosis and equine infectious anaemia) (Mullen & Durden, 2002). Studies of recent epizootics in Europe have focused on the role of tabanids as mechanical vectors in the epidemiology of bovine besnoitiosis, bovine anaplasmosis and equine infectious anaemia (Naranjo *et al.*, 2006; More *et al.*, 2008; Jacquiet *et al.*, 2010). Moreover, outbreaks of surra (*Trypanosoma evansi*) occurred in France (2006) and in Spain (2008) after the introduction of infected camels from the Canary Islands (Gutierrez *et al.*, 2010). Tabanids and stable flies were likely to have transmitted the parasite among the animals, showing the potential risk of transmission of exotic pathogens by biting flies in Europe.

Like other haematophagous Diptera, female tabanids can find their host by heat, odour or visual cues (Allan *et al.*, 1987). Tabanids are mainly diurnal, and visual stimuli seem to assist their final orientation in host location, whereas olfactory stimuli seem to be used for long- and short-range orientation (Gibson & Torr, 1999). Recently, it was demonstrated that tabanids use reflected polarized light from an animal's coat as a signal to find a host (Horvath *et al.*, 2010). Most studies that have examined the odour-orientated responses of these insects have been conducted in Africa, where Tabanidae are sympatric with *Glossina* spp., and in North America. Experiments have mainly consisted of screening known tsetse attractants in outdoor conditions using electric nets or various trapping systems (Gibson & Torr, 1999). Results have shown that aged cow urine, octenol (1-octen-3-ol) and phenols (3- and 4-methylphenol) – but not ketones (including acetone) – were effective attractants for species of Tabanidae, although there were differences in efficacy among groups and species (Gibson & Torr, 1999; Mihok *et al.*, 2007; Mihok & Mulye, 2010). Synergism between ammonia and phenols, a combination that frequently occurs in aged urine, has also been demonstrated for *Hybomitra* species in Ontario (Mihok & Lange, 2011).

To characterize the activity of these mammalian kairomones on biting flies, electroantennography (EAG) has previously been used to record chemo-reception on the antennae of *Glossina* spp. (Bursell *et al.*, 1988; Den Otter, 1991; Gikonyo *et al.*, 2002) and *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) (Schofield *et al.*, 1995; Birkett *et al.*, 2004; Jeanbourquin & Guerin, 2007). It was found that 1-octenol-3-ol, 3-methylphenol and 4-methylphenol were the most electrophysiologically active chemicals for these species. But prior to our study, no EAG experiments had previously been conducted on tabanids.

In Europe, the only previous studies of attractants for tabanids had been carried out in Croatia, where the efficacy of synthetic and natural substances in catching tabanids was investigated (Krcmar *et al.*, 2006; Krcmar, 2007; Krcmar *et al.*, 2010). Aged animal urine, 4-methylphenol and a mixture of octenol, acetone and ammonia appeared to be effective attractants.

To better understand the involvement of odour stimuli in host location and host choice of temperate tabanids, our study coupled, for the first time, a field experiment with electroantennogram recordings. We chose to compare the aged urine of different ungulates as

natural attractants since aged urine is a blend of active compounds, is host-specific (Madubunyi *et al.*, 1996) and has a composition that varies with host physiology (Torr *et al.*, 2006). The aim of the study was to evaluate the attractiveness of the urine from different mammal species in a Mediterranean steppe environment that has been exclusively grazed by sheep for more than 20 centuries, and then to record the electrophysiological responses of tabanids to the extracts of the urine samples used in the field.

Providing the first EAG recordings of tabanids has allowed us to investigate the correspondence between their behavioural and physiological responses to host odours. This study has also allowed us to look at the host-seeking and feeding behaviour of tabanids from a new angle.

Materials and methods

Field experiment

Study site

The field experiment was conducted in the Coussouls de Crau Nature Reserve in southeastern France. La Crau is a unique French landscape of semi-arid pastures. The selected site for the study was the 'Peau de Meau' sheepfold (43°33' E 4°50' N, elevation 10 m, area 160 ha), which has dry steppe vegetation with 50% stone cover (Pictures on Google Earth). This region is characterized by a Mediterranean climate with high inter-annual variability, low rainfall (400–500 mm per year) with maximum precipitation in spring and autumn, long hot summers and mild winters (mean annual temperature 14°C). On average, the sun shines 3,000 hours per year, and there is a very strong predominant wind (the mistral) that blows from the northwest 334 days per year, thus increasing evapotranspiration (Blight *et al.*, 2011). In the plain, flocks of Merinos d'Arles sheep are rotated from hay fields (fourth cutting) in autumn to the steppe in spring, with transhumance carried out by truck to the Alps for the summer (Buisson & Dutoit, 2006). During the study, no sheep were present in the Peau de Meau sheepfold, but flocks were present in other sheepfolds that were less than 1 km away.

La Crau was a choice study site. Firstly, sheep grazing has been the traditional land use in this region for many centuries, so sheep are the quasi-exclusive host for haematophagous Diptera here. Secondly, the area is wide open and has only herbaceous plants, with no high woody plants to disturb either the visual cues of Nzi traps from a distance (Mihok, 2002) or the movement of the air, so this aids the reliability of directional cues available to tabanids orienting towards an odour source (Gibson & Torr, 1999).

Meteorological data

Meteorological effects on the daily activity of tabanids have showed that different species respond differently to weather variables. The meteorological variables that influence the activity of tabanids are wind velocity, temperature, relative humidity or evaporation, atmospheric

pressure, sky radiation or cloud cover (Burnett & Hays, 1974; Dale & Axtell, 1975; Alverson & Noblet, 1977; Van Hennekeler *et al.*, 2011). In our study, daily climate data were obtained from the meteorological station of Istres, which is 20 km from the study site. The weather changed during the experiment, with alternating sunny and cloudy days. The maximum temperatures ranged from 25.9°C to 30.7°C, the mean wind-chill temperatures ranged from 24.2°C to 29.9°C and the mean humidity ranged from 37% to 64%. The wind-chill considers the effect of wind on heat loss from exposed skin (Bluestein *et al.*, 2002). There was no precipitation except on 22 June (0.2 mm) and 23 June (0.4 mm). The maximum wind speeds were in the range of 33–46 km/h and the wind direction was from N, NW, SW or S. The moderate multidirectional winds during the study period could have affected the catches, so the behavioural results must be interpreted with caution (Mohamed-Ahmed & Mihok, 1999).

Trapping and experimental design

New Nzi traps were used as standard traps (Figure 1). The Nzi trap is a multipurpose trap for biting flies designed by Mihok (2002). The blue and black components of the traps were made from the same fabric (SuperMaine 300 g cotton/polyester 65/35, TDV industries, France). The cone and the back of the trap were made from polyester mosquito netting.

The experiment consisted of setting up one 4x4 Latin square from 14–17 June and a second identical Latin square from 20–23 June 2011. Four Nzi traps were set up in the open facing west at 200-m intervals along a line running northeast to southwest, at a right angle to the predominant wind and parallel to the closest canal. This alignment was chosen firstly because flies approach a host from downwind (Phelps & Vale, 1976), and secondly because with their single entrance, Nzi trap efficacy is dependent on their orientation to the sun. Mihok (2006) found the highest catches of tabanids in traps facing west (Mihok *et al.*, 2006).

Three traps were baited with urine, and one trap was left unbaited as a control. The first day, 50 ml of aged urine was placed in plastic vials with a 2.5 cm aperture located in the back corner of each trap. The baits and control were randomly moved every day.

The bait urine was collected directly from the bladders of several adult animals in a slaughterhouse (the sheep urine sample was a mixture pooled from 10 ewes, the cow urine from 30 cows and 1 ox, and the horse urine from 10 mares and 1 gelding). The urine was collected from adults because young animals have lower levels of phenols in their urine (Torr *et al.*, 2006). Each sample of urine was left for three weeks at room temperature (20–22°C) in a 1.5-l plastic bottle, and was then stored at –20°C in 250-ml bottles.

The trap collectors containing the tabanids (which were all females) were removed daily and transported to the laboratory. All live tabanids were identified individually and placed in mesh cages (55 x 80 x 40 cm) with access to a 10% sucrose solution provided on thin sponges to prolong their survival (Auroi, 1985). EAG recordings were conducted on tabanids in good

condition for 1–7 days following capture. The ovarian age and the meal status of the females tested were unknown. EAG recordings were not performed on males, as only females were collected during our study.

Laboratory experiment

Odour stimuli

Each sample of aged urine was extracted with 50 ml of dichloromethane (1:1) in an Erlenmeyer flask for four hours. These extracts were then aliquoted and stored at -20°C . 1-octen-3-ol, a well-known attractant for many haematophagous Diptera (Hall *et al.*, 1984; Gibson & Torr, 1999), was used to validate the experimental system. Aliquot dilutions of pure octenol ($1\text{ mg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) were prepared using dichloromethane: 0.1, 0.01, and 0.001. Octenol at $0.1\text{ mg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ was used as a positive control, and dichloromethane was used as a negative control.

Electroantennography

Antennal electrical responses to volatile compounds were recorded with a Syntech electroantennograph device (Hilversum, Netherlands). EAG recordings were made using electrolyte-filled (0.1 M KCl) glass capillary electrodes, with Ag/AgCl wire making contact with the recording apparatus. The tabanids were first immobilized by cold temperatures (2 minutes at -20°C). EAGs were recorded using a technique similar to those previously used for biting flies (Den Otter & Saini, 1985; Den Otter *et al.*, 1988; Schofield *et al.*, 1995; Jeanbourquin & Guerin, 2007). The antenna was excised from the tabanid's head, as the EAG signal was found to be better without the head (unpublished data). The indifferent electrode was inserted into the pedicel of the antenna, and the recording electrode was brought into contact with the distal end of the flagellum. Parashar *et al.* have described that the majority of olfactory sensilla (for females of four species of tabanids) are present on the first segment of the flagellum (Parashar *et al.*, 1994). Furthermore, Stoffolano *et al.* have shown through previous electrophysiological experiments the presence of gustatory chemosensilla at the tip of tabanids' antennae (Stoffolano *et al.*, 1990).

The antenna was maintained in a humidified charcoal-filtered air stream delivered at $13.5\text{ ml}\cdot\text{s}^{-1}$ through a metal tube. Each stimulus was prepared by depositing $10\text{ }\mu\text{l}$ of the tested solution on a strip of filter paper ($40 \times 5\text{ mm}$) placed in a glass Pasteur pipette. The solvent was allowed to evaporate for 15 minutes before the first use, and the same pipettes were used for four antennae from different individuals (corresponding to 1 hour of the experiment). The tip of the pipette was connected to the metal tube, and the stimulus was delivered to the antenna by blowing an air pulse ($20\text{ ml}\cdot\text{s}^{-1}$ for 0.8 s). Stimuli were released successively in random order at 60-second intervals to avoid receptor saturation.

Statistical analyses

We compared the catches from different trap positions, different trapping days and different baits using the non-parametric Kruskal-Wallis test. Differences in catches from baited traps versus unbaited traps were evaluated using the non-parametric Wilcoxon signed-rank test. The effect of

meteorological conditions on catches was analyzed with the Spearman's rank correlation test. Differences in EAG responses and odour stimuli were evaluated using the non-parametric Wilcoxon signed-rank test. All analyses were performed with PAST 2.12 (Hammer *et al.*, 2001).

Results

Field experiment

A total of 7,038 tabanids (all females) belonging to 10 species in the genera *Tabanus*, *Atylotus* and *Hybomitra* were collected (Table 1). All the species are common to southern France (Rageau & Mouchet, 1967; Chvala *et al.*, 1972; Raymond, 1978). Catches were dominated by two species: *Tabanus bromius* (57%) and *Atylotus quadrifarius* (41%). Daily catches of *T. bromius* were positively correlated with the maximum temperature and the mean wind-chill temperature (respectively, $R_s=0.80/p=0.02$ and $R_s=0.95/p=0.0003$). No significant correlation occurred for *A. quadrifarius* ($R_s=0.34/p=0.40$ and $R_s=0.52/p=0.19$).

Only the two dominant species *T. bromius* and *A. quadrifarius* were sufficiently abundant to be studied. In comparing the catches from different trap positions and trapping days for both species, there was only a significant difference among trapping days for *T. bromius* ($H_c=22.81/p=0.0018$).

Our results found that:

- Nzi traps baited with aged cow urine seemed to increase catches of *T. bromius* (2-fold) and of *A. quadrifarius* (1.7 fold) in comparison with unbaited Nzi traps (Table 2), but statistical results were not significant.
- Nzi traps baited with aged horse urine significantly enhanced catches of *T. bromius* (1.6-fold) and *A. quadrifarius* (3.5-fold) in comparison with unbaited traps.
- Nzi traps baited with aged sheep urine collected significantly more *A. quadrifarius* (2.5-fold), and also tended to collect more *T. bromius* (1.7-fold), in comparison with unbaited traps.
- No significant differences appeared between baits either for *T. bromius* ($H_c=0.34/p=0.84$) or for *A. quadrifarius* ($H_c=2.05/p=0.35$).

Laboratory experiment

For *T. bromius*, EAG peak amplitude increased in a dose-dependent fashion with an increased octenol dose, and the mean EAG amplitude elicited by each of the doses (oct1: 1.25 ± 0.06 mV, oct0.1: 1.38 ± 0.08 mV, oct0.01: 1.23 ± 0.08 mV, oct0.001: 0.66 ± 0.06 mV) was greater than for the control (dichloromethane: 0.26 ± 0.03 mV) (Figure 2). The mean EAG amplitude elicited by octenol at $0.001 \text{ mg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ($10 \mu\text{g}$) was significantly lower than that for higher doses. The dose-response relationship was sigmoid, with EAG amplitudes reaching a maximum at a dose of $0.01 \text{ mg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ($100 \mu\text{g}$) octenol. For *A. quadrifarius*, the mean EAG amplitude elicited by each dose of octenol (oct1: 0.77 ± 0.04 mV, oct0.1: 0.79 ± 0.03 mV, oct0.01: 0.76 ± 0.06 mV, oct0.001: $0.65 \pm$

0.04 mV) was greater than that of the control (dichloromethane: 0.43 ± 0.04 mV), but EAGs were much lower than those of *T. bromius*.

For *T. bromius*, mean EAG amplitudes elicited by the three types of urine (cow: 1.34 ± 0.12 mV, horse: 1.28 ± 0.11 mV and sheep: 1.15 ± 0.06 mV) were greater than those of the control, but there was no significant difference between urine and octenol at $0.1 \text{ mg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ (Figure 3). For *A. quadrifarius*, mean EAG amplitudes elicited by the three types of urine (cow: 1.65 ± 0.13 mV, horse: 1.64 ± 0.12 mV and sheep: 1.23 ± 0.05 mV) were greater than those of the control and of octenol. For both species of tabanids, horse urine and cow urine elicited larger EAGs than sheep urine.

Discussion

Behaviour

Baited and unbaited Nzi traps captured a large number of female tabanids in the plain of La Crau during the study period. On average, we collected 220 tabanids per day per trap. Although there are two main tabanids that coexist here, we collected a variety of species. The efficacy of Nzi traps has been evaluated in Africa, in North America and in Australia (Mihok, 2002; Mihok *et al.*, 2006; Van Hennekeler *et al.*, 2008), but no study had previously reported the use of these traps in Europe. Although we did not compare different trap designs, Nzi traps seemed to be very effective for catching temperate Tabanini species (*Atylotus spp.*, *Tabanus spp.* and *Hybomitra spp.*).

For *T. bromius*, there was a significant difference in catches among trapping days. Maximum and wind-chill temperatures were factors with positive correlation to daily catches of *T. bromius*; catches were lower on cloudy days. These results confirm the effects of meteorological variables on daily activity of tabanids (Van Hennekeler *et al.*, 2011), particularly in terms of temperature and cloud cover.

T. bromius and *A. quadrifarius* seemed to be attracted by aged cow urine. These results were not statistically significant because of the limited number of traps and the large differences in daily catches, but the catch index was over 1.5 for both species. Aged cow urine has also been shown to increase catches of *Hybomitra spp.* in Canada by 1.5–1.9 times using Nzi traps (Mihok & Mulye, 2010) and of tabanids [*Tabanus spp.*, *Hybomitra bimaculata* (Macquart, 1826) and *Haematopota pluvialis* (Linnaeus, 1758)] in Croatia by 51 times using canopy and malaise traps (Krcmar *et al.*, 2006). Cow urine plus acetone and octenol also increased catches of tabanids (*Ancala spp.* and *Tabanus spp.*) in Mali by 2.4 times using pyramidal traps, and by 5.1 times using Vavoua traps (Djiteye *et al.*, 1998).

Regarding the other types of urine, horse urine significantly enhanced catches of both the main tabanid species (1.6–3.5 times), and sheep urine significantly enhanced catches of *A. quadrifarius*

(2.5 times). The Croatian study also showed that catches of tabanids were increased by horse urine (36 times) and sheep urine (30 times) (Krcmar *et al.*, 2006). However, these results cannot be usefully compared to our findings as canopy and malaise traps collected very few tabanids without bait, whereas unbaited Nzi traps were very effective (Mihok & Mulye, 2010). When we compared the total catches from each bait, no significant differences were found. So, the three ungulate urines could be considered as effective attractants for tabanids.

Physiological activity

For *T. bromius*, the highest EAGs were elicited by octenol. This confirms results for other biting flies such as stable flies (Warnes & Finlayson, 1986; Schofield *et al.*, 1995) and tsetse flies (Hall *et al.*, 1984; Den Otter *et al.*, 1988). We also found a dose–response relationship, as has been shown by Schofield *et al.* (1995) and Den Otter *et al.* (1988). In our study, EAGs peaked at a dose of 100 µg. This is compatible with the highest EAG recorded for stable flies and tsetse flies at similar doses: 200 µg and 41.5 µg respectively (Den Otter *et al.*, 1988; Schofield *et al.*, 1995). At high doses of octenol, EAG amplitude decreased between 10^3 µg and 10^4 µg because the antenna reached saturation.

EAG studies must use physiologically meaningful concentrations to prevent potentially misleading results (Bruce *et al.*, 2005). Dose–response curves usually showed a regular increase of depolarization with an increase of compound quantity (Vittecoq *et al.*, 2011). But several examples showed that similar antenna depolarization could be obtained from very different stimulus concentrations, including amounts of compounds in much higher concentrations than would occur naturally (Sasso *et al.*, 2009; Suchet *et al.*, 2011).

For *A. quadrifarius*, EAGs elicited by octenol were very low in comparison with EAGs elicited by urine, and relative EAG amplitudes for octenol never exceeded twice the relative EAG amplitude for dichloromethane. These results contrasted markedly with those obtained from *T. bromius*, *S. calcitrans* and *Glossina spp.* Octenol was less electrophysiologically active for *A. quadrifarius* than for other biting flies. However, there is considerable evidence of the attractiveness of octenol to tabanids. For example, in the Croatian study, octenol increased catches of tabanids by 7.7 times (*Tabanus spp.* and *Haematopota pluvialis*) in canopy traps (Krcmar *et al.*, 2005), and in the Canadian study, it increased catches of tabanids up to 3.6 times (*Tabanus spp.* and *Chrysops spp.*) on sticky enclosures surrounding Nzi traps (Mihok *et al.*, 2007). Yet in Croatia, the catch of *Atylotus loewianus* (Villeneuve, 1920) collected from canopy traps baited with octenol and aged horse urine did not differ significantly (Krcmar *et al.*, 2005), and aged donkey urine collected significantly more *A. loewianus* than did traps baited with a mixture of octenol, acetone and ammonia (5:3:2) (Krcmar *et al.*, 2010). The low electrophysiological activity of octenol on antennae of *A. quadrifarius* may explain why not all biting flies respond to octenol alone or in combination with other attractants.

For *T. bromius* and *A. quadrifarius*, urine elicited large EAG amplitudes, and horse urine and cow urine elicited larger EAGs than sheep urine. Differences in EAGs could be explained by a difference in the volatile chemicals emitted by aged urine. These results are consistent with the biology of tabanids, because most species, particularly those of the Tabaninae subfamily, feed predominantly on large mammals such as cattle, horses and deer (Mullen & Durden, 2002). In the field, the attractiveness of the three types of urine was quite similar despite some differences in the catch index. Aged urine gradually accumulates phenolic attractants due to microbial activity (Okech & Hassanali, 1990), and probably many other active chemicals that may have indifferent or repellent effects. Mammal urines and their phenol constituents (3-methylphenol, 4-methylphenol and 3-*n*-propylphenol) have been tested in outdoor experiments with contrasting results on tabanids (Gibson & Torr, 1999; Mihok & Mulye, 2010). Synergism between ammonia and phenols is likely to explain these observations (Mihok & Lange, 2011). Moreover, Torr *et al.* underlined the effects of host physiology (weight and/or age) on the presence and level of kairomones in cattle odour, including urine (Torr *et al.*, 2006). Therefore, it would be useful to compare the composition of volatile odorants in different mammal urines using gas chromatography and to conduct EAG tests on tabanids to determine the physiological activities of phenols and other urinary compounds such as ammonia, as has been done with tsetse flies (Bursell *et al.*, 1988) and stable flies (Jeanbourquin & Guerin, 2007).

Host-seeking and feeding behaviour

In the field, we observed a significant attraction of *A. quadrifarius* to sheep odours, although the species was only moderately sensitive to the extract of aged sheep urine. In this area, sheep are the quasi-exclusive host for these flies. During the study, two sheep flocks and a few horses were present less than 1 km from the trapping zone. Associative learning experiments previously conducted on haematophagous Diptera have shown that these insects were able to recognize an odour associated with a blood meal. For example, *Culex quinquefasciatus* adults can learn to associate a conditioned odour (vanilla or strawberry) with an unconditioned stimulus such as sugar or a blood source (Tomberlin *et al.*, 2006), and tsetse flies preferred to feed on a host encountered for a first meal two days previously (Bouyer *et al.*, 2007). Although the attraction of aged sheep urine for *A. quadrifarius* contrasts with the trophic preferences of Tabaninae, one hypothesis could be that individuals that have previously encountered a sheep might then be attracted by sheep odours.

Studies using serological tests to identify the blood source of meals have shown that tabanids have opportunistic feeding habits (Magnarelli & Anderson, 1980; Muzari *et al.*, 2010). In Louisiana in the United States, domesticated animals, especially cattle and horses, are the main hosts of tabanids, but in localities where cattle are absent, deer are of major importance (Wilson & Richards, 1969). In Australia, Muzari *et al.* (2010) found that all tabanids fed on at least three of the four hosts tested (horse, cow, macropod and pig) suggesting a level of opportunistic feeding (despite a preference for macropods).

To follow up on physiological and ecological explanations for our results, a comparison using ungulates' urine in a location where cattle or horses are predominant hosts may be useful.

Control strategy

Tabanid control is difficult to achieve. Typical host contact is only about 4 minutes per fly during blood feeding, which may occur only once every 3–4 days (Mullen & Durden, 2002). As horse flies are partly independent of livestock, integrated control strategies are required to reduce their impact (Foil & Hogsette, 1994). The use of traps provides a potential control technique, but the development of better attractants is needed to effectively reduce the number of tabanids attacking cattle. Several studies in Africa, in North America and in Europe have tested the use of different attractants: synthetic compounds, alone or in mixtures, or excretory products of host animals, such as urine (Gibson & Torr, 1999; Mihok & Mulye, 2010). Contrasting results have emerged from these studies, suggesting that it will be very difficult to find a universal attractant for Tabanidae, a family of over 4,000 species and at least 137 genera (Foil & Hogsette, 1994). Our study's first EAG recordings on two different tabanid species showed that their physiological activities were not similar. Moreover, it is likely that host availability might influence the behavioural responses of horse flies to host odours. The results of our study could be useful for matching bait used in trapping devices to species of Tabanidae and the livestock present, and thus improve control of horse flies in a push–pull strategy.

Acknowledgements

We are indebted to Michel Martinez of CBGP-INRA for training in the identification of Tabanidae. We are also grateful to Laurent Tatin of the Coussouls de Crau Nature Reserve for his help in the field, to Jean-Claude Vala of the University of Orléans for useful discussions, and to Gerard Duvallat of the University of Montpellier-CEFE for reviewing the manuscript. All EAG recordings were performed at the CEFE Platform of Chemical Analysis. Identifications of Tabanidae were made with the help of the collection of the CBGP in Montpellier.

References

- Allan, S. A., Day, J. F. & Edman, J. D. (1987) Visual ecology of biting flies. *Annu Rev Entomol*, **32**, 297-316.
- Alverson, D. R. & Noblet, R. (1977) Activity of female Tabanidae (Diptera) in relation to selected meteorological factors in South Carolina. *J Med Entomol*, **14**, 197-200.
- Auroi, C. (1985) Energy reserves and carbohydrate feeding in field-caught, female horse flies (*Haematopota pluvialis*) (Diptera: Tabanidae). *Myia*, **3**, 403-414.
- Birkett, M. A., Agelopoulos, N., Jensen, K. M. V., Jespersen, J. B., Pickett, J. A., Prijs, H. J., *et al.* (2004) The role of volatile semiochemicals in mediating host location and selection by nuisance and disease-transmitting cattle flies. *Medical and Veterinary Entomology*, **18**, 313-322.

- Blight, O., Fadda, S., Orgeas, J., Ponel, P., Buisson, E. & Dutoit, T. (2011) Using stone cover patches and grazing exclusion to restore ground-active beetle communities in a degraded pseudo-steppe. *Journal of Insect Conservation*, **15**, 561-572.
- Bluestein, M., Oszcewski, R. & Ams. (2002) The basis for the new wind chill temperature chart. *15th Conference on Biometeorology and Aerobiology Joint with the 16th International Congress on Biometeorology*, 168-171.
- Bouyer, J., Pruvot, M., Bengaly, Z., Guerin, P. M. & Lancelot, R. (2007) Learning influences host choice in tsetse. *Biol Lett*, **3**, 113-116.
- Bruce, T. J. A., Wadhams, L. J. & Woodcock, C. M. (2005) Insect host location: a volatile situation. *Trends in Plant Science*, **10**, 269-274.
- Buisson, E. & Dutoit, T. (2006) Creation of the natural reserve of La Crau: Implications for the creation and management of protected areas. *Journal of Environmental Management*, **80**, 318-326.
- Burnett, A. M. & Hays, K. L. (1974) Some influences of meteorological factors on flight activity of female horse flies (Diptera: Tabanidae). *Environmental entomology*, **3**, 515-521.
- Bursell, E., Gough, A. J. E., Beevor, P. S., Cork, A., Hall, D. R. & Vale, G. A. (1988) Identification of components of cattle urine attractive to tsetse flies, *Glossina* spp. (Diptera, Glossinidae). *Bulletin of Entomological Research*, **78**, 281-291.
- Chvala, M., Lyneborg, L. & Moucha, J. (1972) The horse flies of Europe (Diptera, Tabanidae). In, pp. 498. Entomological Society of Copenhagen.
- Dale, W. E. & Axtell, R. C. (1975) Flight of the salt marsh Tabanidae (Diptera), *Tabanus nigrovittatus*, *Chrysops atlanticus* and *C. fuliginosus*: correlation with temperature, light, moisture and wind velocity. *J Med Entomol*, **12**, 551-557.
- de Bruyne, M. & Baker, T. C. (2008) Odor detection in insects: Volatile codes. *Journal of Chemical Ecology*, **34**, 882-897.
- Den Otter, C. J. (1991) Olfactory responses of tsetse flies to phenols from buffalo urine. *Physiological entomology*, **16**, 401-410.
- Den Otter, C. J. & Saini, R. K. (1985) Pheromone perception in the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. *Entomologia experimentalis et applicata*, **39**, 155-161.
- Den Otter, C. J., Tchicaya, T. & Van den Berg, M. J. (1988) Olfactory sensitivity of five species of tsetse (*Glossina* spp.) to 1-octen-3-ol, 4-heptanone, 3-nonanone and acetone. *Insect Science and its Application*, **9**, 213-218.
- Djiteye, A., Diarra, M., Ouattara, I. & Traore, D. (1998) Comparison of the efficacy of different traps and attractants for Tabanidae and *Stomoxys* in Mali. *Journal of Protozoology Research*, **8**, 263-273.
- Foil, L. D. & Hogsette, J. A. (1994) Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies. *Rev Sci Tech*, **13**, 1125-1158.
- Gibson, G. & Torr, S. J. (1999) Visual and olfactory responses of haematophagous Diptera to host stimuli. *Medical and Veterinary Entomology*, **13**, 2-23.
- Gikonyo, N. K., Hassanali, A., Njagi, P. G. N., Gitu, P. M. & Midiwo, J. O. (2002) Odor composition of preferred (buffalo and ox) and nonpreferred (waterbuck) hosts of some savanna tsetse flies. *Journal of Chemical Ecology*, **28**, 969-981.
- Gutierrez, C., Desquesnes, M., Touratier, L. & Buscher, P. (2010) *Trypanosoma evansi*: Recent outbreaks in Europe. *Veterinary Parasitology*, **174**, 26-29.
- Hall, D. R., Beevor, P. S., Cork, A., Nesbitt, B. F. & Vale, G. A. (1984) 1-Octen-3-ol. A potent olfactory stimulant and attractant for tsetse isolated from cattle odours. *Insect Science and its Application*, **5**, 335-339.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T. & Ryan, P. D. (2001) PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia electronica*, **4**, 2-9.
- Horvath, G., Blaho, M., Kriska, G., Hegedus, R., Gerics, B., Farkas, R., et al. (2010) An unexpected advantage of whiteness in horses: the most horsefly-proof horse has a depolarizing white coat. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, **277**, 1643-1650.

- Jacquet, P., Liénard, E. & Franc, M. (2010) Bovine besnoitiosis: epidemiological and clinical aspects. *Vet Parasitol*, **174**, 30-36.
- Jeanbourquin, P. & Guerin, P. M. (2007) Sensory and behavioural responses of the stable fly *Stomoxys calcitrans* to rumen volatiles. *Med Vet Entomol*, **21**, 217-224.
- Krcmar, S. (2007) Responses of Tabanidae (Diptera) to canopy traps baited with 4-methylphenol, 3-isopropylphenol, and naphthalene. *Journal of Vector Ecology*, **32**, 188-192.
- Krcmar, S., Hribar, L. J. & Kopi, M. A. (2005) Response of Tabanidae (Diptera) to natural and synthetic olfactory attractants. *Journal of Vector Ecology*, **30**, 133-136.
- Krcmar, S., Mikuska, A. & Merdić, E. (2006) Response of Tabanidae (Diptera) to different natural attractants. *J Vector Ecol*, **31**, 262-265.
- Krcmar, S., Mikuska, A. & Radolic, V. (2010) Comparison of sampling tabanids (Diptera: Tabanidae) by four different potential attractants. *Journal of Applied Entomology*, **134**, 608-613.
- Madubunyi, L. C., Hassanali, A., Ouma, W., Nyarango, D. & Kabii, J. (1996) Chemoecological role of mammalian urine in host location by tsetse, *Glossina* spp. (Diptera: Glossinidae). *Journal of Chemical Ecology*, **22**, 1187-1199.
- Magnarelli, L. A. & Anderson, J. F. (1980) Feeding-behavior of Tabanidae (Diptera) on cattle and serological analysis of partial blood meals. *Environmental Entomology*, **9**, 664-667.
- Mihok, S. (2002) The development of a multipurpose trap (the Nzi) for tsetse and other biting flies. *Bull Entomol Res*, **92**, 385-403.
- Mihok, S., Carlson, D. A., Krafur, E. S. & Foil, L. D. (2006) Performance of the Nzi and other traps for biting flies in North America. *Bull Entomol Res*, **96**, 387-397.
- Mihok, S., Carlson, D. A. & Ndegwa, P. N. (2007) Tsetse and other biting fly responses to Nzi traps baited with octenol, phenols and acetone. *Med Vet Entomol*, **21**, 70-84.
- Mihok, S. & Lange, K. (2011) Synergism between ammonia and phenols for Hybomitra tabanids in northern and temperate Canada. *Med Vet Entomol*.
- Mihok, S. & Mulye, H. (2010) Responses of tabanids to Nzi traps baited with octenol, cow urine and phenols in Canada. *Medical and Veterinary Entomology*, **24**, 266-272.
- Mohamed-Ahmed, M. M. & Mihok, S. (1999) Responses of *Glossina fuscipes fuscipes* (Diptera: Glossinidae) and other Diptera to carbon dioxide in linear and dense forests. *Bulletin of Entomological Research*, **89**, 177-184.
- More, S. J., Aznar, I., Myers, T., Leadon, D. P. & Clegg, T. A. (2008) An outbreak of equine infectious anaemia in Ireland during 2006: The modes of transmission and spread in the Kildare cluster. *Equine Veterinary Journal*, **40**, 709-711.
- Mullen, G. R. & Durden, L. A. (2002) *Medical and veterinary entomology*. Academic Press, Amsterdam ; Boston.
- Muzari, M. O., Burgess, G. W., Skerratt, L. F., Jones, R. E. & Duran, T. L. (2010) Host preferences of tabanid flies based on identification of blood meals by ELISA. *Veterinary Parasitology*, **174**, 191-198.
- Naranjo, V., Ruiz-Fons, F., Hofle, U., De Mera, I. G. F., Villanua, D., Almazan, C., et al. (2006) Molecular epidemiology of human and bovine anaplasmosis in Southern Europe. *Century of Rickettsiology: Emerging, Reemerging Rickettsioses, Molecular Diagnostics, and Emerging Veterinary Rickettsioses*, **1078**, 95-99.
- Okech, M. & Hassanali, A. (1990) The origin of phenolic tsetse attractants from host urine - studies on the pro-attractants and microbes involved. *Insect Science and Its Application*, **11**, 363-368.
- Parashar, B. D., Chauhan, R. S., Prakash, S. & Rao, K. M. (1994) Mechanotactile and olfactory antennal sensilla in four species of female tabanids (Diptera). *Bollettino Di Zoologia*, **61**, 121-128.
- Phelps, R. J. & Vale, G. A. (1976) Studies on the local distribution and on the methods of host location of some Rhodesian Tabanidae (Diptera). *Journal of the Entomological Society of South Africa*, **39**, 67-81.
- Rageau, J. & Mouchet, J. (1967) Les arthropodes hématophages de Camargue. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. med.*, **V**, 263-281.
- Raymond, H. L. (1978) Horse flies (Tabanidae) of Camargue - Preliminary report. *La Terre Et La Vie- Revue D'Ecologie Appliquee*, **32**, 291-303.

- Sasso, R., Iodice, L., Woodcock, C. M., Pickett, J. A. & Guerrieri, E. (2009) Electrophysiological and behavioural responses of *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae) to tomato plant volatiles. *Chemoecology*, **19**, 195-201.
- Schofield, S., Cork, A. & Brady, J. (1995) Electroantennogram responses of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, to components of host odor. *Physiological Entomology*, **20**, 273-280.
- Stoffolano, J. G., Angioy, A. M., Crnjar, R., Liscia, A. & Pietra, P. (1990) Electrophysiological recordings from the taste chemosensilla of *Tabanus nigrovittatus* (Diptera, Tabanidae) and determination of behavioral tarsal acceptance thresholds. *Journal of Medical Entomology*, **27**, 14-23.
- Suchet, C., Dormont, L., Schatz, B., Giurfa, M., Simon, V., Raynaud, C., *et al.* (2011) Floral scent variation in two *Antirrhinum majus* subspecies influences the choice of naive bumblebees. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **65**, 1015-1027.
- Tomberlin, J. K., Rains, G. C., Allan, S. A., Sanford, M. R. & Lewis, W. J. (2006) Associative learning of odor with food- or blood-meal by *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Naturwissenschaften*, **93**, 551-556.
- Torr, S. J., Mangwiro, T. N. C. & Hall, D. R. (2006) The effects of host physiology on the attraction of tsetse (Diptera : Glossinidae) and *Stomoxys* (Diptera : Muscidae) to cattle. *Bulletin of Entomological Research*, **96**, 71-84.
- Van Hennekeler, K., Jones, R. E., Skerratt, L. F., Fitzpatrick, L. A., Reid, S. A. & Bellis, G. A. (2008) A comparison of trapping methods for Tabanidae (Diptera) in North Queensland, Australia. *Medical and Veterinary Entomology*, **22**, 26-31.
- Van Hennekeler, K., Jones, R. E., Skerratt, L. F., Muzari, M. O. & Fitzpatrick, L. A. (2011) Meteorological effects on the daily activity patterns of tabanid biting flies in northern Queensland, Australia. *Medical and Veterinary Entomology*, **25**, 17-24.
- Vittecoq, M., Djieto-Lordon, C., Buatois, B., Dormont, L., McKey, D. & Blatrix, R. (2011) The Evolution of Communication in Two Ant-Plant Mutualisms. *Evolutionary Biology*, **38**, 360-369.
- Warnes, M. L. & Finlayson, L. H. (1986) Electroantennogram responses of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, to carbon-dioxide and other odors. *Physiological Entomology*, **11**, 469-473.
- Wilson, B. H. & Richards, C. G. (1969) Tabanid hosts in estuarine and aluvial areas of louisiana. *Annals of the Entomological Society of America*, **62**, 1043-&.
- Zwiebel, L. J. & Takken, W. (2004) Olfactory regulation of mosquito-host interactions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **34**, 645-652.

Table 1. Female tabanids collected by Nzi traps in the Peau de Meau sheepfold, June 2011.

Species	Total
<i>Tabanus bromius</i> Linnaeus 1758	3,999
<i>Atylotus quadrifarius</i> (Loew 1874)	2,920
<i>Atylotus flavoguttatus</i> (Szilady 1915)	62
<i>Tabanus regularis</i> Jaennicke 1866	38
<i>Tabanus rectus</i> Loew 1858	11
<i>Hybomitra ciureai</i> (Seguy 1937)	4
<i>Hybomitra expollicata</i> (Pandelle 1883)	1
<i>Tabanus cordiger</i> Meigen 1820	1
<i>Tabanus eggeri</i> Schiner 1868	1
<i>Tabanus sudeticus</i> Zeller 1842	1

Table 2. Catches of *Tabanus bromius* and *Atylotus quadrifarius* with Nzi traps baited with urine from different types of animals.

	Total catches	Catch Index*	Median value†	Percentiles**	W / P-value‡
<i>Tabanus bromius</i>					
Unbaited traps	620	Control	46.5	27.75 / 107.75	-
Aged cow urine	1289	2.08	89	33 / 195.75	23 / 0.548
Aged horse urine	996	1.60	112	71 / 202.25	33 / 0.043
Aged sheep urine	1094	1.76	87	50.5 / 160.5	29 / 0.151
<i>Atylotus quadrifarius</i>					
Unbaited traps	334	Control	35	17.75 / 67	-
Aged cow urine	569	1.70	83	43 / 100	29 / 0.152
Aged horse urine	1179	3.53	101	68.5 / 200	36 / 0.011
Aged sheep urine	838	2.51	70.5	62.25 / 171.25	35 / 0.019

*Ratio of the total catches in the baited traps / total catches in the unbaited traps

† Median value for catch/day/trap

** 25th percentile / 75th percentile for catch/day/trap

‡ Results of non-parametric Wilcoxon signed-rank test (baited vs. unbaited traps), significant at $P < 0.05$



Fig 1. Nzi trap in the semi-arid pasture of the ‘Peau de Meau’ sheepfold.

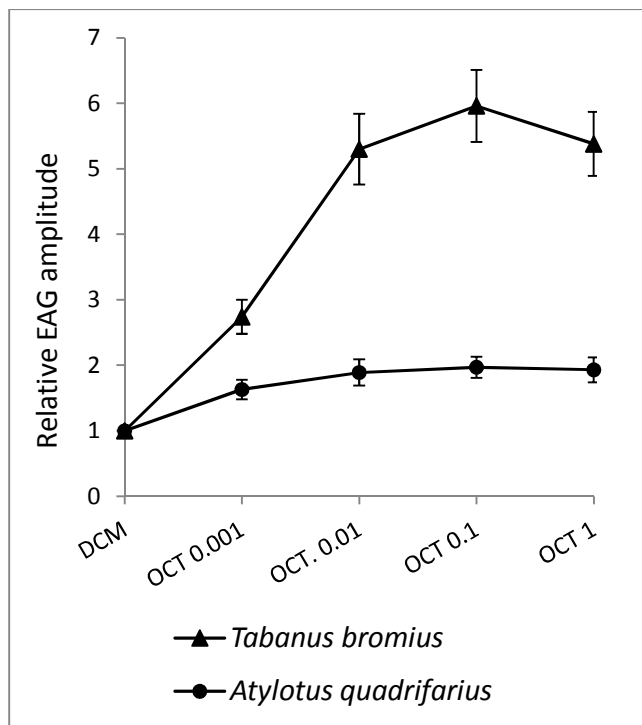


Fig 2. Mean relative EAG amplitude for *Tabanus bromius* (n=12) and *Atylotus quadrifarius* (n=10) treated with a series of octenol (OCT) doses: 0.001, 0.01, 0.1 and 1 ($\text{mg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). Relative EAG amplitude is the value of 1 for the dichloromethane (DCM).

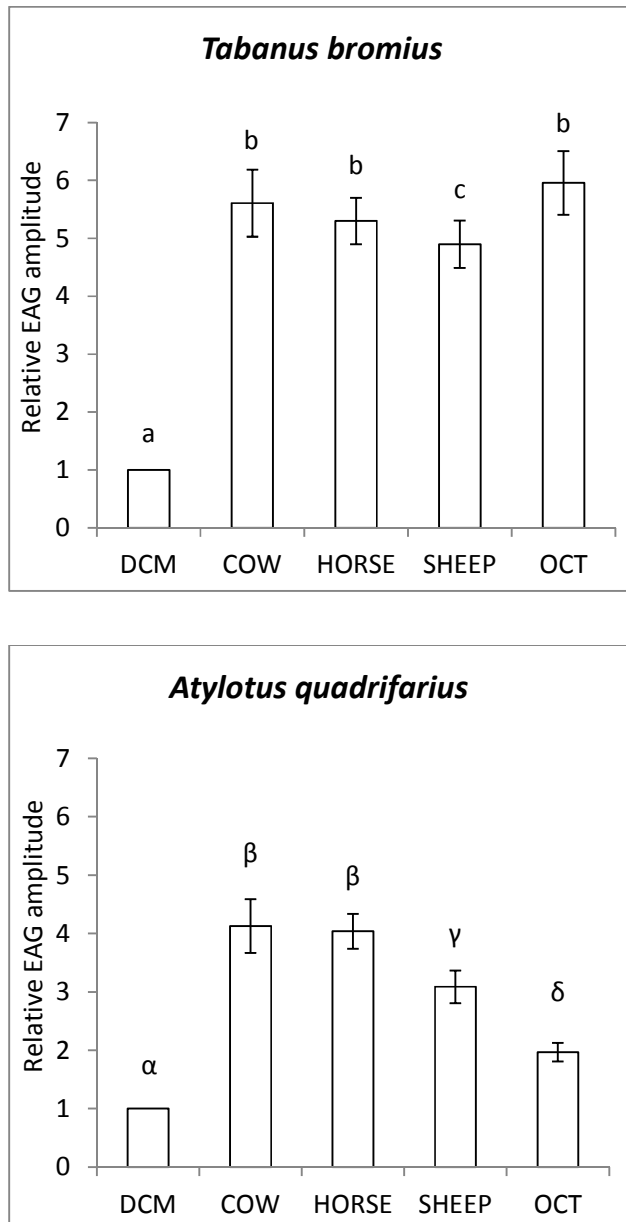


Fig 3. Mean relative EAG amplitudes for *Tabanus bromius* (n=12) and *Atylotus quadrifarius* (n=10) treated with three extracts of animal urine (COW, HORSE, SHEEP). Octenol (OCT) at $0.1 \text{ mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ was used as a positive control. Relative EAG amplitude was a value of 1 for the dichloromethane (DCM). Differences in EAG amplitudes were evaluated using Wilcoxon signed-rank tests. Significant differences were represented by different letters ($P \leq 0.01$, except for b versus c $P \leq 0.05$).

3.2.4. Sensibilité olfactive à l'octénol, aux phénols et à l'urine de cheval

Article 5 : Olfactory responses of tabanids to octenol, phenols and aged horse urine

F. Baldacchino, S. Manon, L. Puech, B. Buatois, L. Dormont & P. Jay-Robert.

Medical and Veterinary Entomology, in press. doi: 10.1111/mve.12038.

Résumé

Suite aux résultats obtenus lors de l'étude précédente, nous avons souhaité approfondir nos investigations sur l'attractivité des urines en focalisant notre attention sur l'urine de cheval, la plus attractive, et ses composés volatils. Compte-tenu des contraintes imposées par l'expérimentation de terrain, les tests se sont limités à l'urine et à trois de ses composants : l'octénol, le 4-méthylphénol (4MP) et le 3-*n*-propylphénol (3PP), seuls ou combinés.

Tout d'abord, nous avons analysé la composition de l'urine de cheval, préalablement vieillie pendant trois semaines. Les composés volatils de l'urine de cheval ont été captés par microextraction sur phase solide à l'aide de fibres SPME (Solide-Phase MicroExtraction). L'analyse de ces composés a été faite par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse. 29 composés ont ainsi été identifiés notamment des cétones (11), des alcools gras (6) et des phénols (5). L'octénol et le 3PP ont été détectés en petite quantité (<2% du mélange) tandis que le 4MP était le volatil le plus abondant (79%). La concentration en 4MP dans l'urine de cheval a ensuite été dosée par étalonnage externe grâce à une solution tampon à différentes concentrations. Elle était de 0,42 mg/L.

Les enregistrements EAG ont été réalisés dans les mêmes conditions que dans l'article 4 à l'exception de l'hexane utilisé à la place du dichlorométhane pour la dilution des différents composés et comme témoin négatif. Pour *T. bromius* et *A. quadrifarius*, les réponses antennaires ont été doses-dépendantes avec l'octénol, le 4MP, le 3PP et une combinaison 4MP:3PP (16:1) (Figure 21). Le 4MP provoque des réponses EAG significativement très supérieures à celles obtenues avec l'octénol ou le 3PP. Les phénols en mélange donnent des réponses EAG significativement supérieures à celles déclenchées par le 4MP seul surtout aux faibles concentrations.

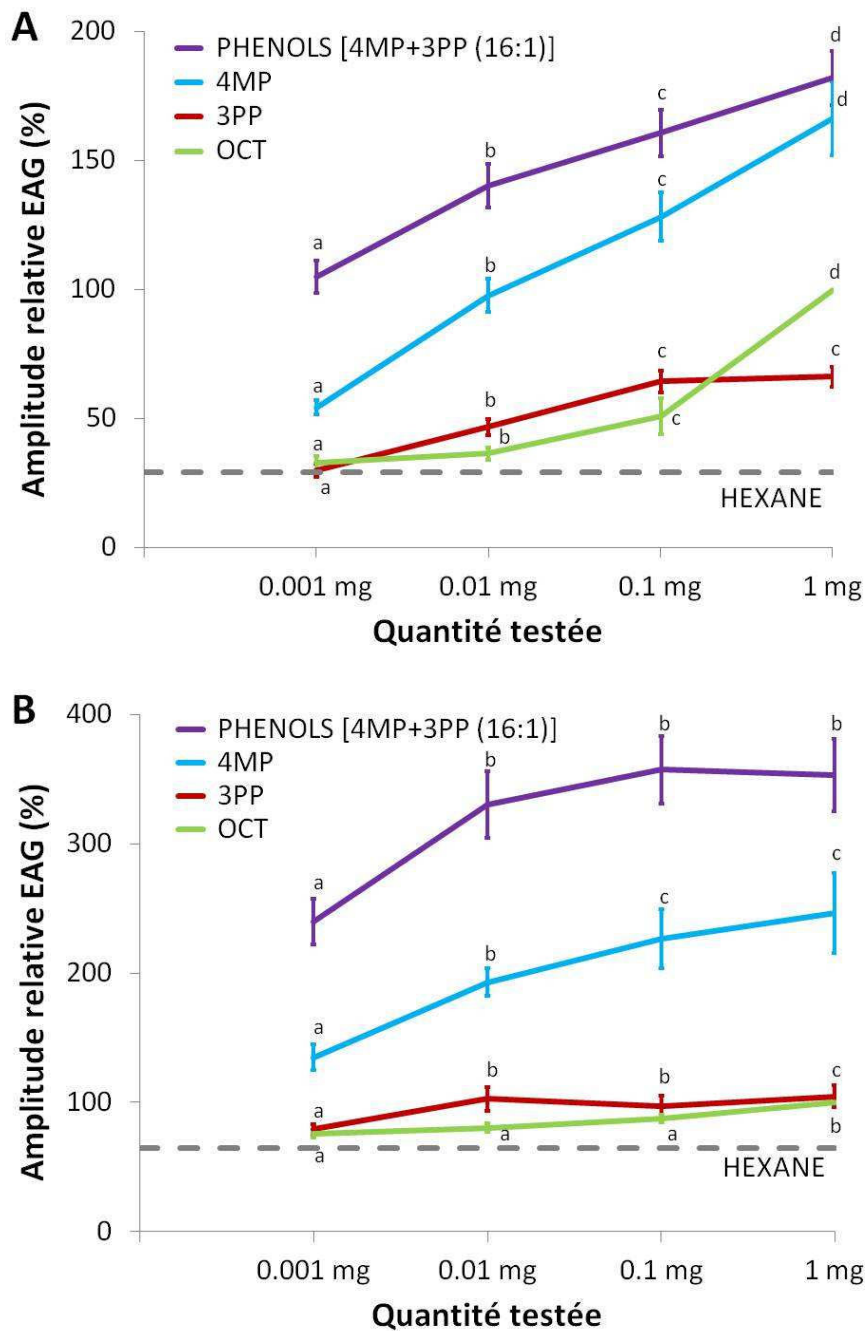


Figure 21. Réponses EAG de (A) *T. bromius* et (B) *A. quadrifarius*

Les antennes ont été stimulées par des doses croissantes de 1-octen-3-ol (OCT), 3-propylphénol (3PP), 4-méthylphénol (4MP) et un mélange de phénols (4MP:3PP, 16:1). L'octénol 1 mg/μL est utilisé comme valeur de référence (100%) pour la normalisation des réponses EAG. Les différences significatives entre deux doses successives sont notées avec des lettres différentes (test de rang de Wilcoxon, $P < 0,05$).

La réponse à un mélange de composés n'est pas une fonction simple liée aux réponses des composés testés séparément (Laing & Francis, 1989). L'interaction entre ces composés peut se faire au niveau des récepteurs périphériques ou bien au niveau du lobe antennaire (Carlsson & Hansson, 2002). Seuls des enregistrements électrophysiologiques sur la sensille (SCR-EAG, Single Cell Recording EAG) permettent de démontrer des interactions au niveau de l'antenne. D'après nos résultats EAG, nous pouvons toutefois suggérer l'existence d'une synergie entre les phénols, en particulier aux quantités très faibles qui peuvent être captées par l'insecte dans son environnement naturel.

Nous avons également enregistré des réponses EAG très fortes avec l'urine de cheval, en particulier pour *A. quadrifarius*. Les réponses EAG provoquées par l'urine (dans laquelle la concentration en 4MP = $0,42 \cdot 10^{-6}$ mg/ μ L) sont significativement supérieures aux réponses EAG provoquées par le 4MP à la plus faible dose testée ($1 \cdot 10^{-4}$ mg/ μ L) et similaires à celles provoquées par les doses plus fortes. La forte activité de l'urine sur les récepteurs des antennes de taons semble donc liée à la présence de différents composés actifs qui pourraient agir en synergie.

Parallèlement à la caractérisation des réponses physiologiques, l'attractivité de différentes odeurs a été évaluée en Crau. Nous avons testé les combinaisons suivantes : urine de cheval seule, octénol + ammoniacque, phénols (4MP:3PP, 16:1) + ammoniacque, ammoniacque seule. Nous avons utilisé de l'ammoniacque car Mihok & Lange (2012) ont démontré un effet synergique entre l'ammoniacque et les phénols.

Les résultats comportementaux contrastent légèrement par rapport aux réponses physiologiques. Si les pièges avec attractifs augmentent les collectes de *T. bromius* (x1,8 à 2,2) et d'*A. quadrifarius* (x2,7 à 4,1), pour *T. bromius*, aucune différence n'a été observée entre les trois combinaisons. En revanche, pour *A. quadrifarius*, l'urine de cheval (x4,1) attire davantage que l'octénol (x2,8) et que les phénols (x2,7). Pour ces tests, l'urine a été placée dans un flacon avec une ouverture de 2,2 cm de diamètre. Le taux d'évaporation de l'urine a été estimé à 6,8 mL/jour soit pour le 4MP présent dans l'urine $0,12 \cdot 10^{-3}$ mg/h. L'octénol et les phénols ont diffusé à travers des sachets en polyéthylène. Le taux d'évaporation du 4MP à travers ce type de sachet est de 0,38 mg/h d'après Torr *et al.* (1997). L'attractivité de l'urine pour *A. quadrifarius* ne s'explique donc

pas par la quantité de 4MP émise mais certainement par la présence d'autres composés qui restent à identifier.

Comme chez les insectes phytophages, la reconnaissance des hôtes par les taons dépend probablement de la détection de molécules volatiles communes présentes dans l'air à un ratio donné plutôt que de la détection ou non de molécules particulières (Bruce *et al.* 2005). Par exemple, chez l'eudémis, *L. botrana*, un ravageur de la vigne, la localisation des grappes est codée par un ratio spécifique de trois terpénoïdes communs dans les émissions volatiles des plantes (Tasin *et al.* 2006).

Nos observations confirment également les différences interspécifiques qui existent chez les Tabanidae vis-à-vis des attractifs. Au regard des réponses EAG et des collectes de terrain, il semblerait qu'*A. quadrifarius* soit plus sensible aux urines et à leurs constituants phénoliques que *T. bromius*. En Croatie, des pièges Canopy appâtés avec de l'urine d'âne attirent significativement plus d'*A. loewianus* qu'un mélange octénol:acétone:ammoniaque (5:3:2) alors qu'il n'y a pas de différence entre ces deux attractifs pour *Tabanus* spp. (Krčmar *et al.* 2010). Comme chez les glossines, certaines espèces de taons pourraient être moins sensibles aux stimuli olfactifs mais plus réceptives aux stimuli visuels (Torr & Solano 2010). Ceci expliquerait pourquoi nous n'avons pas observé de différences entre les combinaisons d'odeurs chez *T. bromius* avec les pièges Nzi.

Article 5 : Olfactory responses of tabanids to octenol, phenols and aged horse urine

F. Baldacchino, S. Manon, L. Puech, B. Buatois, L.Dormont & P. Jay-Robert.

Medical and Veterinary Entomology, in press. doi: 10.1111/mve.12038.

Olfactory and behavioural responses of tabanids to octenol, phenols and aged horse urine

F. BALDACCHINO¹, S. MANON¹, L. PUECH¹, B. BUATOIS², L. DORMONT¹ AND P. JAY-ROBERT¹

¹Unité Mixte de Recherche (UMR) 5175, Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive (CEFE), Université Paul-Valéry (UM3), 34199, route de Mende, Montpellier cedex 5, France and ² UMR 5175, CEFE, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), 1919 route de Mende, 34293 Montpellier cedex 5, France

Abstract. Electrophysiological and behavioural responses of females of two tabanid species (*Tabanus bromius* and *Atylotus quadrifarius*) to ammonia, octenol (1-octen-3-ol), phenols and aged horse urine were compared. EAG responses of both species to octenol, 4-methylphenol (4MP), 3-propylphenol (3PP) and a phenol mixture (4MP and 3PP at a ratio of 16:1) increased in a dose-dependent fashion. The most effective stimulus was 4MP, and synergism between the two phenols might exist. Aged horse urine also elicited strong EAG responses in both species. Using GC-MS analysis, we identified 29 compounds in horse urine; in particular, ketones, fatty alcohols and phenols, among which 4MP was the most abundant component (~80%). Trapping experiments were carried out using Nzi traps baited with various odours. Octenol and the phenol mixture in combination with ammonia increased catches of tabanids 1.8 to 2.8 times relative to ammonia on its own. Aged horse urine increased catches of *T. bromius* and *A. quadrifarius* 2.2 and 4.1 times, respectively. The high attractiveness of aged horse urine, especially for *A. quadrifarius*, is likely not to be due to 4MP alone, but to the mixture of various active compounds involved in host location.

Key words. Tabanidae, baits, electroantennography, horse flies, host odours, Nzi trap, octenol, urine phenols.

Introduction

Locating a vertebrate host is crucial for blood-sucking insects to fulfil their nutritional and reproductive requirements. Typically, biting Diptera must locate a distant, mobile food source, which is frequently difficult to find and which has evolved defences against insect attack (Gibson & Torr, 1999). In general, insects use visual and olfactory stimuli, aided by anemotactic and optomotor responses (Paynter & Brady, 1996; Gibson & Torr, 1999; Horvath & Varju, 2004) and chemical signals are the principal cues with which they identify their hosts (Takken & Knols, 2010). A better understanding of the involvement of kairomones in host location for haematophagous Diptera is of interest since identifying the chemical compounds that affect vector–host interactions should help in more effectively luring target insects to sampling devices and/or removing them from the environment using pest management methods (Spath, 1997; Bernier *et al.*, 2007; Logan & Birkett, 2007; Harrup *et al.*, 2012; Pinto *et al.*, 2012).

Biting flies generally show marked activation and attraction to carbon dioxide (CO₂), which is present in mammalian breath, but are also attracted to other cues emanating from hosts (Birkett *et al.*, 2004). The role of natural host odours in host location was demonstrated with tsetse flies in Zimbabwe by Vale (1974). Since then, numerous studies have identified the semiochemicals involved in host location and selection for tsetse flies; for example, octenol (1-octen-3-ol), a component of ruminant breath, and phenols, especially 4-methylphenol (4MP) and 3-propylphenol (3PP), known to be the key compounds in urine that elicit attraction of tsetse flies (Hall *et al.*, 1984; Owaga *et al.*, 1988). *P*-cresol or 4MP is also commonly found in rumen fluid odour collections (Harraca *et al.*, 2009) and in dung volatiles (Dormont *et al.*, 2010).

In contrast, the semiochemicals used by tabanids have received little attention. Horse flies are a serious nuisance to livestock and can mechanically transmit several animal pathogens (Mullen & Durden, 2002). In Europe, recent epizootics have focused on the role of tabanids as mechanical vectors in the transmission of equine infectious anaemia and besnoitiosis, considered emerging diseases (EFSA, 2010; Jacquiet *et al.*, 2010; ANSES, 2012; Gentile *et al.*, 2012; Maresca *et al.*, 2012).

Previous behavioural studies in the field have focused on tsetse attractants such as octenol, phenols and urine. Octenol has been proved to be an effective attractant, as traps baited with octenol caught 2–9 times more tabanids compared to unbaited traps (Gibson & Torr, 1999; S. Krčmar *et al.*, 2005; Mihok & Carlson, 2007). Reports on the use of phenols as bait have been more conflicting. In Croatia, canopy traps baited with 4MP collected 16 times more tabanids than unbaited traps (Krčmar, 2007), whereas in Canada, catches in Nzi traps baited with phenols did not collect more than unbaited traps, though it should be considered that Nzi traps are much more effective without bait than canopy traps (S. Krčmar, 2007; Mihok & Mulye, 2010). Aged animal urine has also been shown to be a good attractant in the field for *Tabanus* spp., *Atylotus* spp. and *Hybomitra* spp. in North America and in Europe (Stjepan Krčmar *et al.*, 2006; Mihok & Mulye, 2010; Baldacchino *et al.*, 2012). The synergism between ammonia and phenols demonstrated for *Hybomitra* spp. may explain the attractiveness of aged urine (Mihok & Lange, 2012).

To determine the activity of mammalian kairomones on horse flies, electrophysiological responses to urine volatiles have been recently reported for two species (Baldacchino *et al.*, 2012). *Tabanus bromius* Linnaeus 1758 and *Atylotus quadrifarius* (Loew 1874) were both found to be sensitive to urine volatiles, with electroantennogram (EAG) responses similar to or greater than those for octenol. Moreover, cow and horse urine elicited stronger EAG responses than did sheep urine, which is consistent with the biology of horse flies as they feed predominantly on large mammals. These results suggest that tabanids may perceive and react to species-specific compounds, or specific ratios of ubiquitous compounds, to recognize a host. However, there were no significant differences in tabanid catches in the field using these urines as baits.

Two phenols (4MP and 3PP) are thought to account for most of the attractive properties of cattle urine, and binary mixtures of the two significantly increase catches of tsetse flies (Owaga *et al.*, 1988; Vale *et al.*, 1988). However, it may be that other unidentified active components are involved in the attractiveness of urine, as combinations of these two kairomones appear to be less than 50% as attractive as natural cattle odour in some circumstances (Gikonyo *et al.*, 2003). For temperate tabanids, the involvement of phenols in the attractiveness of aged urine remains unclear.

The goal of this study was to evaluate the response of females of two species of tabanids (*T. bromius* and *A. quadrifarius*) to phenols (4MP and 3PP) in comparison to aged horse urine by using electroantennogram recordings and field experiments. Our specific questions were: Is the urine blend more active and attractive than the two phenols? Do 4MP and 3PP principally account for the attractiveness of urine for tabanids? Do urine volatiles act together synergistically on tabanid responses? Do EAG responses reflect behavioural responses by tabanids to phenols and urine volatiles?

Materials and methods

Odour stimuli

All chemicals used in this study were purchased from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Switzerland). These included 1-octen-3-ol (98%), 4-methylphenol (98%), 3-propylphenol (>99%), dioctyl phthalate ($\geq 99.5\%$) and ammonium hydroxide solution (5.0 M). The ammonium solution was diluted to obtain a 5% ammonia solution. A phenol binary mixture was made using 16 parts 4MP to 1 part 3PP. Dilutions were prepared using hexane (0.1, 0.01, 0.001 and 0.0001 mg/ μ L). Octenol at 0.1 mg/ μ L was used as a positive control, and hexane was used as a negative control in the electrophysiological recordings.

Horse urine was collected directly from the bladders of 10 mares and one gelding. The urine was collected from adults as young cattle have lower levels of phenols in their urine (Torr *et al.*, 2006). The urine was kept for 3 weeks at room temperature (20–22 °C) in a 1.5 L plastic bottle and was then stored at -20 °C in 250 mL bottles.

Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of horse urine volatiles

The atmospheric concentrations of urine phenols were estimated using solid-phase microextraction (SPME) with two 65 μ m polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB) Stable Flex fibers (Supelco, Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA, USA). The two fibers were conditioned in a GC inlet kept at 250 °C for 30 minutes before sampling and were used simultaneously to collect volatiles over two samples of the same urine. 100 μ L of aged horse urine (3 weeks old) was deposited in two 20 mL amber glass vials. One SPME fiber was exposed in each vial for 20-minutes at 25 °C.

The quantity of 4MP in horse urine was assessed by the external standard method. 4MP was dissolved with 3PP at a ratio of 24:1 in ammonium hydroxide solution (0.5%). Acetic acid was used to produce a solution with a pH similar to that of urine (pH ~8). A calibration curve was obtained at three concentrations (0.048, 0.48 and 4.8 mg/L). Sampling was done using the same conditions as for the aged horse urine with the same SPME fibers. A logarithmic curve was obtained for the total peak area, and the regression coefficient provided $R^2 > 0.94$. The calculated concentration of 4MP was based on the established standard curve.

GC-MS analyses of SPME extracts were performed using a Shimadzu GCMS-QP2010 Plus quadrupole mass spectrometer (Shimadzu Scientific Instruments, Kyoto, Japan). GC-MS analyses were conducted with a potential of 70 eV for ionization by electron impact, with the transfer line heated to 270 °C and the temperature of the ion source programmed at 250 °C. The mass spectrometer was used in scan mode, from a 38 to 600 m/z ratio. The Shimadzu QP2010 Plus was equipped with a 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm SLB™-5ms (Supelco) fused silica capillary column. The injector temperature was 250 °C (splitless mode). The column temperature was programmed at 40 °C (for 5 minutes) then increased to 220 °C at 5 °C/min and to 250 °C at 10 °C/min. The carrier gas was helium, with a constant flow rate set to 1.0 mL/min. Compounds were identified by matching the mass spectra with data from the NIST 2005 and Wiley (9ed) MS software libraries and a personal laboratory bank of mass spectra. Compound identification was confirmed by comparing the retention indices (RI) with data from libraries and published data (Adams, 2007), and also by comparison with the retention time of standards. The relative amount of each compound was expressed with respect to the total volatiles in order to compare the volatile profiles of the samples.

Electroantennogram recordings

EAG recordings from antennae of female *T. bromius* and *A. quadrifarius* were recorded as in Baldacchino *et al.* (2012) with an EAG recording device (Electrode holders, EAG combi probe internal gain x10, stimulus controller CS-55 and signal acquisition controller IDAC-2; Syntech, Hilversum, the Netherlands). Recordings were made using electrolyte-filled (0.1 m KCl) glass capillary electrodes, with Ag/AgCl wires making contact with the EAG recording device. The antenna was maintained in a humidified charcoal-filtered air stream delivered at 13.5 mL/s through a metal tube. Each stimulus was prepared by depositing 10 µL of the test solution on a strip of filter paper (20 × 5 mm) placed in a glass Pasteur pipette and the solvent was allowed to evaporate for 15 minutes before first use.

The tip of the pipette was connected to the metal tube, and the stimulus was delivered to the antenna using an air pulse (20 mL/s for 0.8 s). We used one antenna per compound at the different doses (corresponding to less than 10 min recordings per antenna). Stimuli were released successively in random order at 60-second intervals to avoid antennal receptor cell saturation.

Study site of the field experiment

The field experiment was conducted in the Coussouls de Crau Nature Reserve in southeastern France. This study site is characterized by open steppe and high populations of tabanids in the early summer. The trapping site was at the Peau de Meau sheepfold (43°33'N, 04°50'E; elevation 10 m a.s.l., area 160 ha). This region is influenced by a Mediterranean climate with high interannual variability, low rainfall (400–500 mm/year) with maximum precipitation in spring and autumn, long hot summers, and mild winters (mean annual temperature 14 °C). On average, the sun shines 3000 hours per year, and a very strong predominant wind (the mistral) blows from the northwest 334 days per year, thus increasing evapotranspiration (Blight *et al.*, 2011). During the study, no sheep were present in the Peau de Meau sheepfold, but flocks were present in other sheepfolds at a distance of less than 1 km.

Field site meteorological data

Tabanid activity is influenced by meteorological variables such as wind velocity, temperature, relative humidity (RH) or evaporation, atmospheric pressure, and sky radiation or cloud cover (Van Hennekeler *et al.*, 2011). Daily climate data were obtained from the meteorological station at Istres, which is located 20 km from the study site. The weather conditions were relatively good during the study period, with only a few cloudy days. Maximum daily temperatures ranged from 22.4 °C to 34.1 °C (mean = 28.4°C), and RH at midday ranged from 28% to 82% (mean = 46%). There was no precipitation except on 11 June 2012 (11.8 mm), 1 July 2012 (6 mm) and 5 July 2012 (0.6 mm). The maximum wind speeds were in the range of 7.8–20.6 m/s (mean = 13.1 m/s) with very variable wind directions.

Field experimental design

New Nzi traps were used as standard device as it is a multipurpose trap for biting flies designed by Mihok (2002). The efficiency of an odour-baited Nzi trap was estimated at 20-30% for tsetse flies and stable flies in Kenya (Mihok *et al.*, 2007), and at 91% (45% when unbaited) for three species of Sudanese tabanids (Mohamed-Ahmed *et al.*, 2007). No experiments have been conducted to estimate the efficiency of Nzi traps for temperate tabanids. However, these traps have previously shown to be very efficient for tabanids in the same study site (Baldacchino *et al.*, 2012). The blue and black components of the traps were made from the same fabric (SuperMaine 300 g cotton/polyester 65/35%; TDV Industries, Laval, France). The cone and the back of the trap were made of polyester mosquito netting. The experiment consisted of setting up five 4 × 4 Latin squares that were in place from 5 June 2012 to 5 July 2012.

Four Nzi traps were set up in the open facing west at 200-m intervals along a line running northeast to southwest, perpendicular to the predominant wind. One trap was baited with ammonia and was used as a control, a second was baited with octenol plus ammonia, a third with the phenol mixture plus ammonia, and a fourth with aged horse urine.

The phenol mixture consisted of a formulation of 4MP and 3PP at a ratio of 16:1. Such combinations of phenols have been used to attract tabanids in Canada, but at a ratio of 8:1

(Mihok & Mulye, 2010). The ratio used in this study was more consistent with ratios of these products in animal urines (Baldacchino, unpublished data). The phenol mixture (3.05 mL of 4MP and 0.19 mL of 3PP) was dispensed in a polyethylene sachet (0.15-mm walls, surface area 50 cm²) (Torr *et al.*, 1997). Octenol (0.76 mL) was dispensed alone, also in a polyethylene sachet. The remaining volume was made up with dioctyl phthalate to have 4 mL in each sachet. Approximate release rates at 27 °C from these dispensers are 0.38 mg/h for 4MP, 0.01 mg/h for 3PP and 0.13 mg/h for octenol (Torr *et al.*, 1997). The polyethylene sachets were suspended from the central support pole of the trap at 50 cm above the ground. The 5% ammonia solution and the aged horse urine were dispensed from 70 mL plastic vials (5x7 cm) with a 2.2-cm aperture placed in the middle of the trap. Mean release rates for ammonia and urine were calculated from the loss of liquid that evaporated in the field at, respectively, 7.9 mL/day and 6.8 mL/day. In the cow urine tested by Mihok and Lange (2012), ammonia content dropped from 6140 mg/L to 1480 mg/L, with exposure to air for 19 days. So, it was expected to have similar relative evaporation rate of ammonia for 5% ammonia solution and for aged horse urine. The concentration of 4MP in the aged horse urine calculated according to the established curve was 0.42 mg/L, so the approximate release rate was 0.12×10^{-3} mg/h. Octenol and 3PP were detected in the aged horse urine at very low levels, 100 times lower than 4MP (Table 1).

Statistical analyses

Differences in EAG responses between different compounds were evaluated using the Mann-Whitney (*U*) test, and differences in EAG responses between different doses of the same compound were evaluated using the non-parametric Wilcoxon signed-rank (*W*) test. The effects of meteorological conditions on catches were analyzed using the Spearman's rank correlation (*r_s*) test. Catches from different trap positions and different baits were compared using the non-parametric Kruskal–Wallis (*H*) test. Differences in catches between baited and control traps were evaluated using the non-parametric Wilcoxon signed-rank (*W*) test. All analyses were performed using PAST Version 2.12 (Hammer *et al.*, 2001).

Results

Electroantennogram responses

For both species, EAG responses increased in a dose-dependent fashion for octenol, 4MP, 3PP and the phenol binary mixture (Fig. 1). EAGs elicited by 4MP were significantly greater than those elicited by octenol and 3PP for both species (*U*-test, $P < 0.001$), and EAGs elicited by the phenol mixture were significantly greater for both species in comparison with EAGs elicited by 4MP alone (*U*-test, $P < 0.05$), except at 1 mg for *T. bromius*. These results suggest a synergism between 4MP and 3PP, particularly at lower doses.

EAG responses to aged horse urine of both species were very high, especially for *A. quadrifarius* (Fig. 2). For *T. bromius* and *A. quadrifarius*, EAG responses elicited by urine were significantly greater than EAGs elicited by 4MP alone at 0.001 mg, although the estimated amount of 4MP on

a filter paper with aged horse urine was 0.42×10^{-5} mg ($\ll 0.0001$ mg). Moreover, for *A. quadrifarius*, there were no significant differences between EAG responses to urine and EAG responses to 4MP at higher doses. Finally, ammonia was also tested as a constituent of urine. For both species, EAGs elicited by 5% ammonia were very low and not significantly different from the negative control (hexane).

Chemical analysis of horse urine volatiles

The chemical composition of aged horse urine odours as analyzed by GC-MS consisted mainly of ketones (11), fatty alcohols (6) and phenols (5) (Table 1). A total of 29 compounds were isolated and identified. The volatile profile was clearly dominated by one component, 4MP (79%). Octenol and 3PP were detected in very small amounts, each accounting for less than 1% of the volatiles.

Field experiment

A total of 7,684 tabanid females belonging to 14 species in the genera *Tabanus*, *Atylotus*, *Hybomitra*, *Pangonius* and *Chrysops* were trapped (Table 2). Most of these species are common in southeastern France and were already trapped at the same site in 2011 (Baldacchino *et al.*, 2012). The two most abundant species in this study were *Tabanus bromius* ($N=6270$, 81%) and *Atylotus quadrifarius* ($N=1156$, 15%) and only these two species were caught in sufficient numbers of value.

Daily catches of *T. bromius* were negatively correlated with the maximum wind speed ($r_s = 0.52$, $P = 0.018$), whereas daily catches of *A. quadrifarius* were positively correlated with maximum temperature ($r_s=0.59$, $P=0.0006$). No significant differences were found in comparisons of the catches at different trap positions for *T. bromius* and *A. quadrifarius* (respectively $H=4.48$, $P=0.21$ and $H=0.68$, $P=0.87$).

Nzi traps baited with octenol (+ ammonia), the phenol mixture (+ ammonia) or aged horse urine significantly increased catches of *T. bromius* (respectively, 2-fold, 1.8-fold and 2.2-fold) and *A. quadrifarius* (respectively, 2.8-fold, 2.7-fold and 4.1-fold) in comparison with the control trap (W -test, $P \leq 0.01$) (Fig. 3). No significant differences were found between baits for *T. bromius* whereas aged horse urine increased catches of *A. quadrifarius* in comparison with traps baited with octenol ($W=108.5$, $p=0.004$, significant) or with the phenol mixture ($W=85.5$, $p=0.15$, not significant) However, the release rate of 4MP from urine (0.12×10^{-3} mg/h) was lower than the release rate of 4MP from the polyethylene sachet (0.38 mg/h). Even if 4MP is the most abundant constituent of the volatiles emitted by aged horse urine, it might not explain the attractiveness of urine on its own.

Discussion

This study is the first to document EAG and behavioural responses of horse flies to phenols. The EAG recordings confirm our previous results with octenol and aged animal urine (Baldacchino *et*

al., 2012) and highlight the activity of phenols as chemostimuli for tabanids. We observed a dose-response relationship with 4MP and 3PP, and 4MP showed high EAG activity for antennae of both *T. bromius* and *A. quadrifarius*, whereas 3PP was only moderately active. Previous studies have shown activity of octenol and these two phenols for other types of biting flies. *Glossina* spp. show EAG responses to 4MP, but lower than EAG responses to octenol (Den Otter *et al.*, 1988; Den Otter, 1991), and EAG responses to 3PP were even lower, except for *Glossina pallidipes* (Austen 1903) (Bursell *et al.*, 1988). For *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus 1758), EAG responses to 4MP were also lower than EAG responses to octenol (Schofield *et al.*, 1995; Jeanbourquin & Guerin, 2007b). By contrast, for *T. bromius* and *A. quadrifarius*, 3PP was proved as active as octenol, 4MP was much more active than octenol and the phenol mixture elicited the greatest responses. The response to an odorant mixture is not a simple function of the responses to its individual components and this phenomenon is called mixture interaction (Laing & Francis, 1989). Such interactions may occur at the peripheral receptor level or in the antennal lobe (Carlsson & Hansson, 2002). Only single-cell electrophysiological recordings can demonstrate a mixture enhancement at the antennal level (Ochieng *et al.*, 2002). EAG responses only permit us to hypothesize about a synergism between 4MP and 3PP, particularly at low concentrations (which would be expected under natural conditions). However, this clearly demonstrates that horse fly antennae are very sensitive to phenols.

The comparisons between EAG responses to urine and to 4MP at different doses showed very high activity in response to urine, especially for *A. quadrifarius*. This activity was not due to 4MP alone, as the quantity of 4MP in aged horse urine applied to the stimulus filter paper was much lower ($<<0.0001\text{mg}$) than the doses of 4MP tested. It was also not due to ammonia, as EAG responses of both tabanid species tested with ammonia were not different than to hexane alone. In contrast, other studies have reported EAG responses to ammonia in other haematophagous insects such as bed bugs, kissing bugs and mosquitoes (Taneja & Guerin, 1997; Syed & Leal, 2009; Harraca *et al.*, 2010). It is likely that the high EAG activity recorded for horse urine from tabanid antennae is due to several compounds present in the mixture. The significant differences observed in other EAG studies in the activity of horse and sheep urine are probably related to their different chemical compositions (Baldacchino *et al.*, 2012).

Nearly 30 compounds were detected in volatiles from aged horse urine. 4MP was the most abundant constituent in aged horse urine in our study as has been found for urine and dung volatiles from ungulates (Okech & Hassanali, 1990; Madubunyi *et al.*, 1996; Dormont *et al.*, 2010). Octenol and 3PP were detected in small amounts and may explain the increased EAG activity of urine for tabanid antennae. However, many other compounds have also been isolated from aged horse urine. Some have been identified in various host odours, such as that of urine, dung, rumen or even body odour (Madubunyi *et al.*, 1996; Gikonyo *et al.*, 2002; Jeanbourquin & Guerin, 2007b; Dormont *et al.*, 2010). Tsetse fly and stable fly antennae have been shown to respond to several of these compounds, such as ketones (4-heptanone, 2- and 3-octanone, 2-nonanone), fatty alcohols (3-octanol) and phenols (phenol, ethylphenol) (Den Otter *et al.*, 1988;

Den Otter, 1991; Schofield *et al.*, 1995; Gikonyo *et al.*, 2002; Birkett *et al.*, 2004; Jeanbourquin & Guerin, 2007b, 2007a). These chemicals may also play roles in the biological activity of aged horse urine. Further investigations on animal urines using GC coupled EAG recordings are warranted to identify novel active compounds for tabanid antennal receptor cells and to better understand their sensory ecology.

In the field experiment, two combinations (octenol + ammonia and a phenol mixture + ammonia) and aged horse urine were tested as baits versus ammonia alone. The control trap with ammonia in 2012 collected less *A. quadrifarius* than the unbaited trap in 2011 (7 per day and 41 per day, respectively). The large decrease between the trapping ratios of this species in 2011 (41%) and 2012 (15%) explains this difference.

Ammonia was used as a control because it did not appear to be an effective attractant on its own. In a study in the United States, although ammonia-baited canopy traps collected more *Hybomitra lasiophthalma* (Macquart 1838) by 2.5-fold, they did not collect more *Tabanus* spp. than unbaited traps (Hribar *et al.*, 1992; Leprince *et al.*, 1994), and in Canada, catches of *Hybomitra* spp. were not increased using ammonia alone relative to an unbaited Nzi trap (Mihok & Lange, 2012). Ammonia has also been tested in combination with octenol in Denmark with canopy traps (Kristensen & Sommer, 2000) and in Canada with Nzi traps (Mihok & Lange, 2012), but in both studies, adding ammonia to an octenol-baited trap had no significant effect. However, ammonia showed a synergistic effect with phenols and cow urine for *Hybomitra* spp. (Mihok & Lange, 2012).

Results of our field tests indicate that octenol plus ammonia and the phenol mixture plus ammonia significantly increased catches of *T. bromius* and *A. quadrifarius* relative to ammonia alone. These findings confirm the attractiveness of octenol and phenols for temperate tabanids. In Croatia, octenol enhanced catches of tabanids 8 times (S. Krcmar *et al.*, 2005), and a mixture of octenol, acetone and ammonia (5:3:2) enhanced catches 14.5 times using canopy traps (S. Krcmar *et al.*, 2010). In Denmark, canopy traps baited with octenol and ammonia collected 4.3 times more *Haematopota pluvialis* (Linnaeus 1758) and 8.6 times more *Hybomitra expollicata* (Pandelle 1883) than unbaited traps (Kristensen & Sommer, 2000). In Canada, relative to an unbaited Nzi trap, catches of horse flies were significantly increased (1.4–2.6 times) with octenol, depending on the species (Mihok & Mulye, 2010; Mihok & Lange, 2012). However, phenolic compounds tested alone or in combination showed contrasting results in the field. In Croatia, canopy traps baited with 4MP collected 16 times more tabanids than unbaited traps (S. Krcmar, 2007), but in Canada, catches were not affected when traps were baited with phenols (4MP and 3PP at a ratio of 8:1), except for *Hybomitra epistates* (Osten Sacken 1878), the catches of which increased 3.2-fold (Mihok & Mulye, 2010; Mihok & Lange, 2012). However, phenols in combination with ammonia and/or octenol resulted in a 1.7–4.1-fold catch increase relative to an unbaited Nzi trap for some species of *Hybomitra* in Canada (Mihok & Lange, 2012).

In our study, aged horse urine was also an effective attractant for *T. bromius* and *A. quadrifarius*. Aged animal urine has previously been observed to increase catches of temperate tabanids. In Croatia, aged urine from cows, horses, sheep, pigs and donkeys allowed (respectively) 51, 36, 30, 22 and 12 times more tabanids to be collected than unbaited canopy traps (Stjepan Krcmar *et al.*, 2006; S. Krcmar *et al.*, 2010). In France, aged urine from cows, horses and sheep increased catches of tabanids 1.6–3.5-fold relative to unbaited Nzi traps (Baldacchino *et al.*, 2012). Moreover, aged equine urine from a pregnant mare, stallion, gelding and mare enhanced catches of horse flies 6.4, 5.4, 3.9 and 3.5 times, respectively, in comparison with unbaited canopy traps (S. Krcmar & Lajos, 2011). This confirms that host physiology influences the presence and level of kairomones in host odour, including urine (Torr *et al.*, 2006).

Finally, in our experiment, catches of *T. bromius* did not differ significantly for any of the baits. However, aged horse urine trapped more *A. quadrifarius* in comparison with octenol or the phenol mixture (significant only for octenol). These findings suggest that (i) tabanid orientation mediated by olfactory signals is not solely dependent on the concentration of the most abundant compound of horse urine, because the release rate of 4MP from aged horse urine was 1000 times lower than the release rate of 4MP from polyethylene sachets, and that (ii) the attractiveness of aged horse urine for tabanids may be due to the mixture of animal kairomones, probably phenolic compounds, as has been demonstrated for tsetse flies (Bursell *et al.*, 1988). Host recognition by tabanids seems to depend on the ratio of host volatiles and not just on the detection of the presence or absence of particular compounds. This mechanism has been shown to be used by phytophagous insects in locating a host plant (Bruce *et al.*, 2005). For example, host location in the grapevine moth *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller 1775) is encoded by a ratio-specific blend of three terpenoids ubiquitous in plant volatiles (Tasin *et al.*, 2006), and responses of males of this species to their sex pheromone are improved in the presence of plant compounds (von Arx *et al.*, 2012).

The results from the field trapping experiments do not reflect the results of the EAG recordings. Indeed, for both species, EAG responses to octenol were weak in comparison to EAG responses to phenols, but there were no differences in catches between traps baited with either octenol or phenols. Conversely, *A. quadrifarius* showed strong EAG responses to aged horse urine, which appeared to be the most effective attractant in the field. Our observations are consistent with a study in Croatia in which canopy traps baited with aged donkey urine collected significantly more *Atylotus loewianus* (Villeuneuve 1920) than did a mixture of octenol, acetone and ammonia (5:3:2) (S. Krcmar *et al.*, 2010). However, there were no differences in catches of *Tabanus* spp. between these two baits. Taking into account the electrophysiological and behavioural responses of *Atylotus* spp., it seems that species of the genus *Atylotus* are more sensitive to animal urine and its phenolic constituents than species of the genus *Tabanus*. Species' sensitivity differences to kairomones may explain differences in the efficacy of attractants used for trapping (Gibson & Torr, 1999; Mihok & Carlson, 2007; Mihok & Mulye, 2010).

To conclude, our study suggested a synergism between 4MP and 3PP on tabanid EAG responses at low concentrations, a combination very likely to be encountered by insects under natural conditions. Aged horse urine was a very active EAG stimulus and a good attractant for horse flies, especially *A. quadrifarius*. The attractiveness of urine is due not only to the presence of 4MP and 3PP, but also to the presence of other compounds that may act synergistically. Further investigations using GC linked EAG recordings should allow these components to be identified to provide a clearer understanding of the relationship between host odour and tabanid behaviour.

Acknowledgements

We would like to thank Laurent Tatin of the Coussouls de Crau Nature Reserve, Guillaume Bosco and Emeric Henrion of the University Paul-Valéry of Montpellier for technical assistance in the field, and Didier Rochat of the National Institute of Agricultural Research of Versailles for useful discussions. We are also grateful to Patrick Guerin of the University of Neuchâtel for providing the polyethylene sachets and Angèle Baldacchino for making the traps. Finally, we are indebted to Jean-Marie Bessière of the National Graduate School of Engineering Chemistry of Montpellier for the analysis of the chemical composition of horse urine. All EAG recordings and GC-MS analysis were made at the CEFÉ – Platform of Chemical Analysis in Ecology of the LabEx CeMEB, “Centre Méditerranéen de l’Environnement et de la Biodiversité”, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier cedex 5, France.

References

- Adams, R. P. (2007) *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th Ed.* Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois.
- ANSES. (2012) [Hiérarchisation de 103 maladies animales présentes dans les filières ruminants, équidés, porcs, volailles et lapins en France métropolitaines, Saisine n° 2010-SA-0280]. ANSES scientific edition, 324 pp.
- Baldacchino, F., Cadier, J., Porciani, A., Buatois, B., Dormont, L. & Jay-Robert, P. (2012) Behavioural and electrophysiological responses of females of two species of tabanid to volatiles in urine of different mammals. *Medical and Veterinary Entomology*, **27**, 77-85.
- Bernier, U. R., Kline, D. L., Allan, S. A. & Barnard, D. R. (2007) Laboratory comparison of *Aedes Aegypti* attraction to human odors and to synthetic human odor compounds and blends. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **23**, 288-293.
- Birkett, M. A., Agelopoulos, N., Jensen, K. M. V., Jespersen, J. B., Pickett, J. A., Prijs, H. J., *et al.* (2004) The role of volatile semiochemicals in mediating host location and selection by nuisance and disease-transmitting cattle flies. *Medical and Veterinary Entomology*, **18**, 313-322.
- Blight, O., Fadda, S., Orgeas, J., Ponel, P., Buisson, E. & Dutoit, T. (2011) Using stone cover patches and grazing exclusion to restore ground-active beetle communities in a degraded pseudo-steppe. *Journal of Insect Conservation*, **15**, 561-572.
- Bruce, T. J. A., Wadhams, L. J. & Woodcock, C. M. (2005) Insect host location: a volatile situation. *Trends in Plant Science*, **10**, 269-274.
- Bursell, E., Gough, A. J. E., Beevor, P. S., Cork, A., Hall, D. R. & Vale, G. A. (1988) Identification of components of cattle urine attractive to tsetse flies, *Glossina* spp. (Diptera, Glossinidae). *Bulletin of Entomological Research*, **78**, 281-291.

- Carlsson, M. A. & Hansson, B. S. (2002) Responses in highly selective sensory neurons to blends of pheromone components in the moth *Agrotis segetum*. *Journal of Insect Physiology*, **48**, 443-451.
- Den Otter, C. J. (1991) Olfactory responses of tsetse flies to phenols from buffalo urine. *Physiological entomology*, **16**, 401-410.
- Den Otter, C. J., Tchicaya, T. & Van den Berg, M. J. (1988) Olfactory sensitivity of five species of tsetse (*Glossina* spp.) to 1-octen-3-ol, 4-heptanone, 3-nonanone and acetone. *Insect Science and its Application*, **9**, 213-218.
- Dormont, L., Jay-Robert, P., Bessiere, J.-M., Rapior, S. & Lumaret, J.-P. (2010) Innate olfactory preferences in dung beetles. *Journal of Experimental Biology*, **213**, 3177-3186.
- EFSA. (2010) Bovine Besnoitiosis: an emerging disease in Europe. Scientific statement on Bovine Besnoitiosis, Question No EFSA-Q-2009-00879, adopted 28.01.2010. EFSA Journal.
- Gentile, A., Militerno, G., Schares, G., Nanni, A., Testoni, S., Bassi, P., *et al.* (2012) Evidence for bovine besnoitiosis being endemic in Italy-First in vitro isolation of *Besnoitia besnoiti* from cattle born in Italy. *Veterinary Parasitology*, **184**, 108-115.
- Gibson, G. & Torr, S. J. (1999) Visual and olfactory responses of haematophagous Diptera to host stimuli. *Medical and Veterinary Entomology*, **13**, 2-23.
- Gikonyo, N. K., Hassanali, A., Njagi, P. G. N., Gitu, P. M. & Midiwo, J. O. (2002) Odor composition of preferred (buffalo and ox) and nonpreferred (waterbuck) hosts of some savanna tsetse flies. *Journal of Chemical Ecology*, **28**, 969-981.
- Gikonyo, N. K., Hassanali, A., Njagi, P. G. N. & Saini, R. K. (2003) Responses of *Glossina morsitans morsitans* to blends of electroantennographically active compounds in the odors of its preferred (buffalo and ox) and nonpreferred (waterbuck) hosts. *Journal of Chemical Ecology*, **29**, 2331-2345.
- Hall, D. R., Beevor, P. S., Cork, A., Nesbitt, B. F. & Vale, G. A. (1984) 1-Octen-3-ol. A potent olfactory stimulant and attractant for tsetse isolated from cattle odours. *Insect Science and its Application*, **5**, 335-339.
- Harraca, V., Ignell, R., Lofstedt, C. & Ryne, C. (2010) Characterization of the Antennal Olfactory System of the Bed Bug (*Cimex lectularius*). *Chemical Senses*, **35**, 195-204.
- Harraca, V., Syed, Z. & Guerin, P. M. (2009) Olfactory and behavioural responses of tsetse flies, *Glossina* spp., to rumen metabolites. *Journal of Comparative Physiology a-Neuroethology Sensory Neural and Behavioral Physiology*, **195**.
- Harrup, L. E., Logan, J. G., Cook, J. I., Golding, N., Birkett, M. A., Pickett, J. A., *et al.* (2012) Collection of culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) using CO₂ and enantiomers of 1-Octen-3-ol in the United Kingdom. *Journal of Medical Entomology*, **49**, 112-121.
- Horvath, G. & Varju, D. (2004) *Polarized light in animal vision : polarization patterns in nature*. Springer Verlag, Heidelberg.
- Hribar, L. J., Leprince, D. J. & Foil, L. D. (1992) Ammonia as an attractant for adult *Hybomitra lasiophthalma* (Diptera, Tabanidae). *Journal of Medical Entomology*, **29**, 346-348.
- Jacquiet, P., Lienard, E. & Franc, M. (2010) Bovine besnoitiosis: Epidemiological and clinical aspects. *Veterinary Parasitology*, **174**, 30-36.
- Jeanbourquin, P. & Guerin, P. M. (2007a) Chemostimuli implicated in selection of oviposition substrates by the stable fly *Stomoxys calcitrans*. *Medical and Veterinary Entomology*, **21**, 209-216.
- Jeanbourquin, P. & Guerin, P. M. (2007b) Sensory and behavioural responses of the stable fly *Stomoxys calcitrans* to rumen volatiles. *Medical and Veterinary Entomology*, **21**, 217-224.
- Krcmar, S. (2007) Responses of Tabanidae (Diptera) to canopy traps baited with 4-methylphenol, 3-isopropylphenol, and naphthalene. *Journal of Vector Ecology*, **32**, 188-192.
- Krcmar, S., Hribar, L. J. & Kopi, M. A. (2005) Response of Tabanidae (Diptera) to natural and synthetic olfactory attractants. *Journal of Vector Ecology*, **30**, 133-136.
- Krcmar, S. & Lajos, P. (2011) Response of Horse Flies to Aged Equine urine (Diptera: Tabanidae). *Entomologia Generalis*, **33**, 245-250.
- Krcmar, S., Mikuska, A. & Merdic, E. (2006) Response of Tabanidae (Diptera) to different natural attractants. *Journal of Vector Ecology*, **31**, 262-265.

- Kremer, S., Mikuska, A. & Radolic, V. (2010) Comparison of sampling tabanids (Diptera: Tabanidae) by four different potential attractants. *Journal of Applied Entomology*, **134**, 608-613.
- Kristensen, P. K. & Sommer, C. (2000) Ammonia and 1-octen-3-ol as attractants for *Haematopota pluvialis*, *Hybomitra expollicata* (Diptera : Tabanidae), and *Morellia* spp. (Diptera : Muscidae). *Journal of Medical Entomology*, **37**, 984-985.
- Laing, D. G. & Francis, G. W. (1989) The capacity of humans to identify odors in mixtures. *Physiology & Behavior*, **46**, 809-814.
- LePrince, D. J., Hribar, L. J. & Foil, L. D. (1994) Responses of horse flies (Diptera, Tabanidae) to Jersey Bullocks and canopy traps baited with ammonia, octenol and carbon dioxide. *Journal of Medical Entomology*, **31**, 729-731.
- Logan, J. G. & Birkett, M. A. (2007) Semiochemicals for biting fly control: their identification and exploitation. *Pest Management Science*, **63**, 647-657.
- Madubunyi, L. C., Hassanali, A., Ouma, W., Nyarango, D. & Kabii, J. (1996) Chemoecological role of mammalian urine in host location by tsetse, *Glossina* spp. (Diptera: Glossinidae). *Journal of Chemical Ecology*, **22**, 1187-1199.
- Maresca, C., Scoccia, E., Faccenda, L., Zema, J. & Costarelli, S. (2012) Equine Infectious Anemia: Active Surveillance in Central Italy 2007-2009. *Journal of Equine Veterinary Science*, **32**, 596-598.
- Mihok, S. (2002) The development of a multipurpose trap (the Nzi) for tsetse and other biting flies. *Bulletin of Entomological Research*, **92**, 385-403.
- Mihok, S. & Carlson, D. A. (2007) Performance of painted plywood and cloth Nzi traps relative to Manitoba and Greenhead traps for tabanids and stable flies. *Journal of Economic Entomology*, **100**, 613-618.
- Mihok, S., Carlson, D. A. & Ndegwa, P. N. (2007) Tsetse and other biting fly responses to Nzi traps baited with octenol, phenols and acetone. *Medical and Veterinary Entomology*, **21**, 70-84.
- Mihok, S. & Lange, K. (2012) Synergism between ammonia and phenols for *Hybomitra* tabanids in northern and temperate Canada. *Medical and Veterinary Entomology*, **26**, 282-290.
- Mihok, S. & Mulye, H. (2010) Responses of tabanids to Nzi traps baited with octenol, cow urine and phenols in Canada. *Medical and Veterinary Entomology*, **24**, 266-272.
- Mohamed-Ahmed, M. M., Abdulla, M. A., Mohamed, Y. O., El Rayah, I. E. & El Amin, Y. E. (2007) Trapability of periurban populations of horseflies (Diptera: Tabanidae) in Karthoum State, Sudan. *Journal of Science and Technology*, **8**, 46-63.
- Mullen, G. R. & Durden, L. A. (2002) *Medical and veterinary entomology*. Academic Press, Amsterdam ; Boston.
- Ochieng, S. A., Park, K. C. & Baker, T. C. (2002) Host plant volatiles synergize responses of sex pheromone-specific olfactory receptor neurons in male *Helicoverpa zea*. *Journal of Comparative Physiology a-Neuroethology Sensory Neural and Behavioral Physiology*, **188**, 325-333.
- Okech, M. & Hassanali, A. (1990) The origin of phenolic tsetse attractants from host urine - studies on the pro-attractants and microbes involved. *Insect Science and Its Application*, **11**, 363-368.
- Owaga, M. L. A., Hassanali, A. & McDowell, P. G. (1988) The role of 4-cresol and 3-normal-propylphenol in the attraction of tsetse flies to buffalo urine. *Insect Science and Its Application*, **9**, 95-100.
- Paynter, Q. & Brady, J. (1996) The effect of wind speed on the flight responses of tsetse flies to CO₂: A wind-tunnel study. *Physiological Entomology*, **21**, 309-312.
- Pinto, M. C., Bray, D. P., Eiras, A. E., Carvalheira, H. P. & Puertas, C. P. (2012) Attraction of the cutaneous leishmaniasis vector *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) to host odour components in a wind tunnel. *Parasites & Vectors*, **5**. DOI: 10.1186/1756-3305-5-210.
- Schofield, S., Cork, A. & Brady, J. (1995) Electroantennogram responses of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, to components of host odor. *Physiological Entomology*, **20**, 273-280.
- Spath, J. (1997) Natural host odours as possible attractants for *Glossina tachinoides* and *G-longipalpis* (Diptera: Glossinidae). *Acta Tropica*, **68**, 149-158.

- Syed, Z. & Leal, W. S. (2009) Acute olfactory response of *Culex* mosquitoes to a human- and bird-derived attractant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 18803-18808.
- Takken, W. & Knols, B. G. J. (2010) *Olfaction in vector-host interactions*. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands.
- Taneja, J. & Guerin, P. M. (1997) Ammonia attracts the haematophagous bug *Triatoma infestans*: Behavioural and neurophysiological data on nymphs. *Journal of Comparative Physiology A*, **181**, 21-34.
- Tasin, M., Backman, A. C., Bengtsson, M., Ioriatti, C. & Witzgall, P. (2006) Essential host plant cues in the grapevine moth. *Naturwissenschaften*, **93**, 141-144.
- Torr, S. J., Hall, D. R., Phelps, R. J. & Vale, G. A. (1997) Methods for dispensing odour attractants for tsetse flies (Diptera:Glossinidae). *Bulletin of Entomological Research*, **87**, 299-311.
- Torr, S. J., Mangwiro, T. N. C. & Hall, D. R. (2006) The effects of host physiology on the attraction of tsetse (Diptera : Glossinidae) and *Stomoxys* (Diptera : Muscidae) to cattle. *Bulletin of Entomological Research*, **96**, 71-84.
- Vale, G. A. (1974) New field methods for studying responses of tsetse flies (Diptera, Glossinidae) to hosts. *Bulletin of Entomological Research*, **64**, 199-208.
- Vale, G. A., Hall, D. R. & Gough, A. J. E. (1988) The olfactory responses of tsetse flies, *Glossina* spp. (Diptera, Glossinidae), to phenols and urine in the field. *Bulletin of Entomological Research*, **78**, 293-300.
- Van Hennekeler, K., Jones, R. E., Skerratt, L. F., Muzari, M. O. & Fitzpatrick, L. A. (2011) Meteorological effects on the daily activity patterns of tabanid biting flies in northern Queensland, Australia. *Medical and Veterinary Entomology*, **25**, 17-24.
- von Arx, M., Schmidt-Buesser, D. & Guerin, P. M. (2012) Plant volatiles enhance behavioral responses of grapevine moth males, *Lobesia botrana* to sex pheromone. *Journal of Chemical Ecology*, **38**, 222-225.

Table 1. Volatile compounds collected over aged horse urine, using solid-phase microextraction (SPME)

RT	RI	Compound	Relative amount
5.98	770	3-Hexanone	*
8.77	847	5-Methyl-hexan-2-one	*
9.35	863	4-Heptanone	*
9.91	878	3-Heptanone	*
10.07	882	2-Heptanone	*
10.50	894	2-Heptanol	*
12.59	949	6-Methyl-5-heptan-2-one	*
13.56	974	1-Octen-3-ol	*
13.65	977	Phenol	*
13.79	980	3-Octanone	*
13.95	984	2-Octanone	*
14.13	989	3-Octanol	**
14.31	994	2-Octanol	*
17.18	1077	4-Methylphenol	****
17.50	1088	o-Guaiacol	*
17.62	1091	2-Nonanone	*
17.87	1099	Linalool	*
19.36	1147	Dehydro-allo-ocimene	*
19.62	1155	3-Nonen-1-ol	*
19.89	1164	3-Hydroxy-acetophenone	*
20.01	1168	Ethylphenol	*
20.17	1173	1-Nonanol	*
20.85	1195	α -Terpineol	*
20.95	1199	Methyl-salicylate	*
22.84	1264	3-Propylphenol	*
25.51	1360	Glycerine triacetate	*
28.09	1459	Dihydro- β -ionone	*
28.27	1467	Dihydro- β -ionol	*
28.39	1471	Geranyl isopropyl alcohol	*

RT=retention time (min); RI=retention index

The relative amount of each compound was expressed with respect to the total volatile compound content in extracts: *<2%; **2–10%; ***10–50%; ****>50%.

Table 2. Tabanids collected in Nzi traps in the Peau de Meau sheepfold, June–July 2012

Species	Total, <i>N</i>
<i>Tabanus bromius</i> Linnaeus 1758	6270
<i>Atylotus quadrifarius</i> (Loew 1874)	1156
<i>Atylotus flavoguttatus</i> (Szilady 1915)	160
<i>Tabanus regularis</i> Jaennicke 1866	26
<i>Hybomitra ciureai</i> (Seguy 1937)	15
<i>Tabanus eggeri</i> Schiner 1868	14
<i>Tabanus sudeticus</i> Zeller 1842	11
<i>Tabanus rectus</i> Loew 1858	9
<i>Tabanus cordiger</i> Meigen 1820	7
<i>Hybomitra expollicata</i> (Pandelle 1883)	5
<i>Hybomitra bimaculata</i> (Macquart 1826)	5
<i>Tabanus darimonti</i> Leclercq 1964	3
<i>Pangonius haustellatus</i> Fabricius 1781	2
<i>Chrysops caecutiens f. ludens</i> (Linnaeus 1758)	1

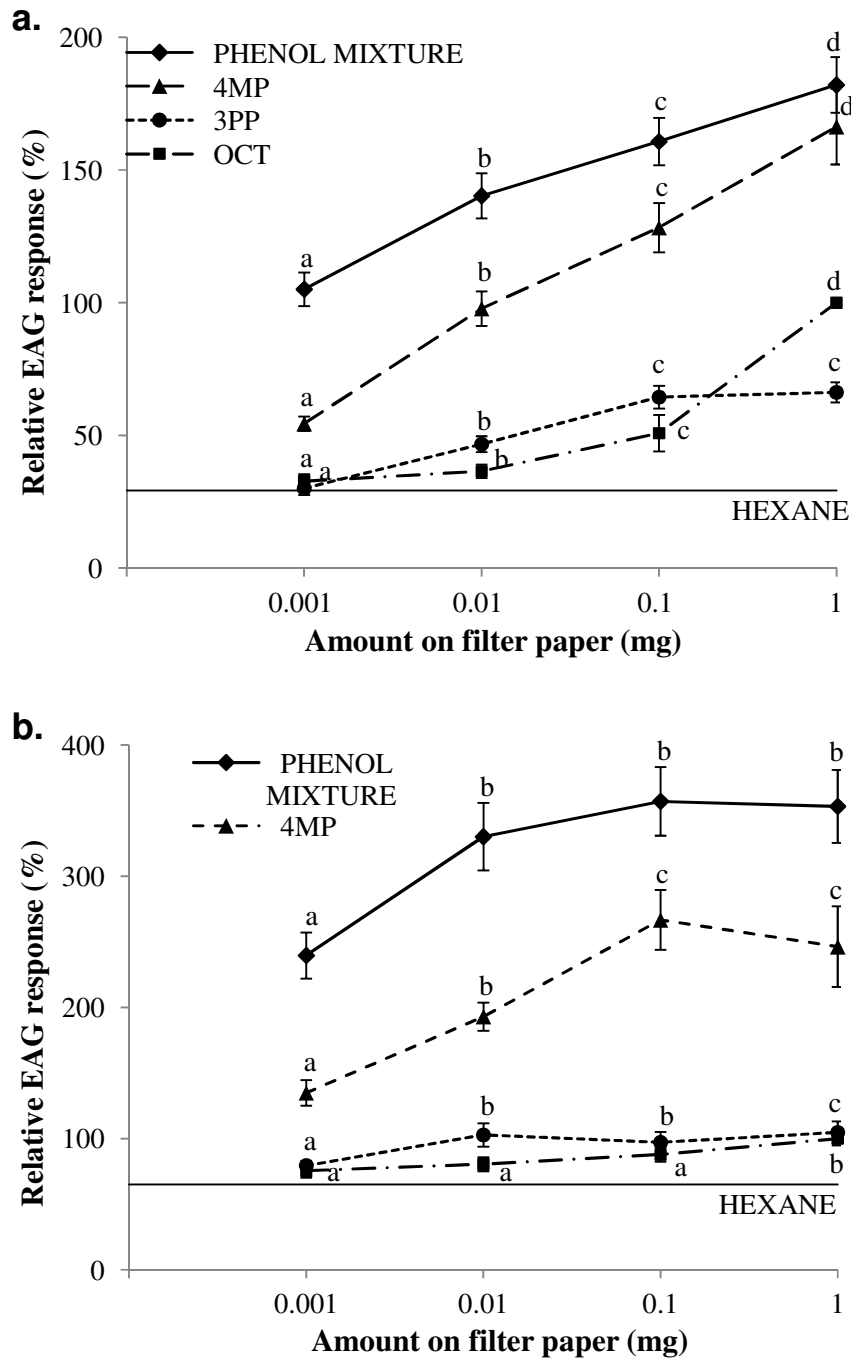


Fig. 1. Electroantennogram (EAG) responses (mean \pm SE) of (a) *T. bromius* (n=10) and (b) *A. quadrifarius* (n=8) antennae stimulated by 1-octen-3-ol (OCT), 3-propylphenol (3PP), 4-methylphenol (4MP) and a phenol binary mixture (4MP+3PP, 16:1). EAG responses are normalized using octenol at 1 mg as reference (100%). For each compound, significant differences between two successive doses are represented by different letters (Wilcoxon signed-rank test, $P < 0.05$)

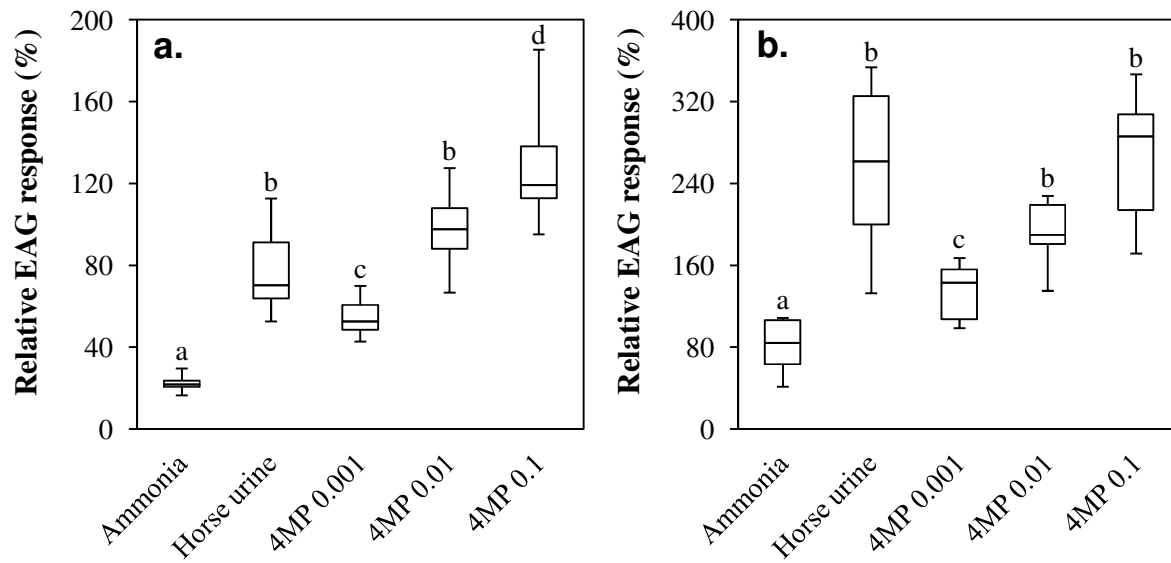


Fig. 2. Relative EAG responses (%) for (a) *T. bromius* (N=10) and (b) *A. quadrifarius* (N=8) antennae stimulated by ammonia (5%), aged horse urine (4MP<<0.0001 mg) and 4-methyphenol (4MP) at increasing doses (mg). Boxplots indicate the inter-quartile range (box), the median value (horizontal line) and 95% range (whiskers) of the responses. Relative EAG response is with reference to octenol at 1 mg (100%). Differences in relative EAG responses between stimuli were evaluated using the Mann-Whitney test. Significant differences are represented by different letters ($P \leq 0.01$)

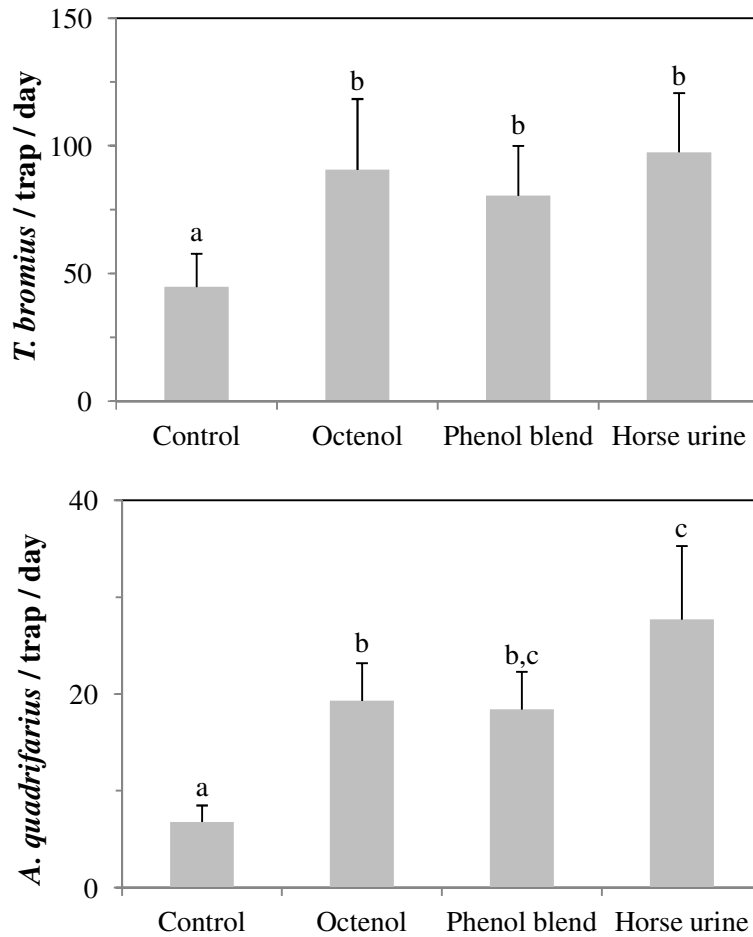


Fig. 3. Mean (\pm SE) catches of *T. bromius* ($N=6,270$) and *A. quadrifarius* ($N=1,156$) per trap and per day. Nzi traps were baited with ammonia (control), octenol (+ ammonia), phenol blend (+ ammonia) and aged horse urine. Differences in catches between baits were evaluated using the Wilcoxon signed-rank test. Bars topped with different letters are significantly different ($P \leq 0.01$)

3.3. Conclusion chapitre

Cette étude combinée de la physiologie olfactive des Tabanidae et de leur comportement vis-à-vis de différents attractifs permet de mieux comprendre les mécanismes olfactifs impliqués dans la recherche d'hôtes.

Les enregistrements des réponses physiologiques ont montré que les urines et leurs principaux composants phénoliques, le 4MP et le 3PP, sont actifs sur les récepteurs cellulaires. Le 4MP, le mélange 4MP:3PP (16:1) et l'urine de cheval vieillie donnent les réponses EAG les plus fortes. Ceci suggère que les phénols (4MP et 3PP) pourraient agir en synergie entre eux (notamment à faibles doses) et même avec d'autres molécules présentes dans l'urine de cheval.

Les collectes sur le terrain montrent une attractivité élevée des urines d'ongulés domestiques, plus spécifiquement pour *A. quadrifarius*. Le 4MP, composant volatil majoritaire des urines (~80% dans l'urine de cheval) n'explique pas, à lui tout seul, cette attractivité. Les femelles taons localiseraient donc leurs hôtes grâce à la détection de plusieurs molécules volatiles communes excrétées par les ongulés dans une certaine proportion.

Les différences interspécifiques observées entre *T. bromius* et *A. quadrifarius* pourraient s'expliquer par le nombre et la composition des récepteurs cellulaires présents sur les antennes chez ces 2 espèces. Par ailleurs, *T. bromius* semble davantage sensible aux stimuli visuels par rapport aux stimuli olfactifs. Chez les Tabanidae, comme chez les glossines, l'importance de la vision et de l'olfaction dans la localisation des hôtes serait variable d'une espèce à l'autre.

D'un point de vue méthodologique, ce travail nous a permis de valider un protocole EAG chez les taons avec l'utilisation de solvants inactifs sur les antennes (dichlorométhane et hexane) et d'un composé de référence (octénol). Dans la continuité de ces travaux, l'utilisation de l'EAG couplé à un chromatographe en phase gazeuse (GC-EAG) permettrait d'identifier tous les composés actifs présents dans les urines d'ongulés. L'identification de ces composés est indispensable afin de limiter les expérimentations sur le terrain et de tester éventuellement l'attractivité de différents mélanges. Un mélange odorant, proche de celui excrété par les hôtes, devrait augmenter l'efficacité des outils de piégeage aujourd'hui disponibles pour contrôler les populations de taons.

Chapitre 4 : Discussion générale

Les Tabanidae constituent une famille de vecteurs assez peu étudiée en Europe, comme dans le reste du monde. L'étude de ces diptères est d'ailleurs compliquée par la richesse en espèces de ce groupe, par la diversité des gîtes larvaires, par leur cycle de vie peu dépendant des animaux domestiques et par l'absence de colonies de laboratoire (Chvála *et al.* 1972; Foil & Hogsette 1994; Mullen & Durden 2002; Andreeva *et al.* 2009). Même si leur impact en santé vétérinaire se limite le plus souvent à la nuisance occasionnée lors de fortes pullulations, la réémergence de l'anémie infectieuse des équidés et de la besnoitiose bovine en Europe de l'ouest, et les foyers de surra détectés en France et en Espagne, montrent que leur rôle de vecteurs mécaniques est à prendre en considération dans la lutte contre ces maladies (Gutierrez *et al.* 2010; Maresca *et al.* 2012; Alvarez-García *et al.* 2013) (Chapitre 1).

Le contrôle des populations de taons reste aujourd'hui un défi car il est difficile d'agir sur les larves (gîtes multiples, larves inaccessibles) et sur les adultes (contact très bref avec leurs hôtes) (Foil & Hogsette 1994). Tenter de réduire les populations de taons à grande échelle et de manière durable semble illusoire et l'approche la plus réaliste à ce jour est l'utilisation de dispositifs de protection afin de diminuer le nombre de piqûres subies par les hôtes. En France, la méthode de lutte la plus utilisée actuellement contre les diptères est l'application d'insecticides (pyréthrinoides de synthèse) sur les animaux, notamment en pour-on. Cependant, l'efficacité des ces produits reste discutable, notamment sur le long terme (concentrations plus faibles sur les sites préférentiels de piqûre des taons, sélection de résistance) (Vale *et al.* 1999; Mohamed-Ahmed & Mihok 2009; Pitzer *et al.* 2010) et leur effet toxique sur l'écosystème (entomofaune utile, faune du sol, faune aquatique) est de plus en plus mis en avant (Wardhaugh 2005; Beynon 2012).

Dans ce contexte, il était important de mieux connaître l'activité des taons dans les estives de haute-montagne, en particulier dans les Pyrénées, région endémique de besnoitiose bovine, (Chapitre 2) et de réfléchir à des méthodes pratiques, efficaces et sélectives pour protéger le bétail dans ce type d'environnement. Les outils de contrôle comme les pièges attractifs ou les répulsifs impliquent d'avoir de bonnes connaissances sur l'olfaction des espèces cibles (Takken

& Knols 2010). C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à la physiologie olfactive des taons et aux composés chimiques qui modulent les interactions avec leurs hôtes (Chapitre 3).

4.1. Nuisance des taons en estive et implications dans la transmission de la besnoitiose bovine

4.1.1. Nuisance des taons en estive

Les taons sont des insectes nuisants à cause de leur vol persistant autour de l'hôte, de leur piqûre douloureuse et de la perte de sang consécutive aux piqûres (Mullen & Durden 2002). La nuisance subie par le bétail est ainsi très liée à l'abondance des populations de femelles adultes. Les collectes effectuées sur les parcours méditerranéens montrent que, malgré la diversité des espèces rencontrées (14 en Crau et 21 en estive), la nuisance est constituée, pour l'essentiel, par quelques espèces dominantes.

Que ce soit en plaine ou en montagne, *T. bromius* est l'espèce la plus capturée puisqu'elle représente 70% des collectes en Crau et 21% des collectes en estive (bilan 2011-2012). *Tabanus bromius* est une espèce ubiquiste, largement distribuée en Europe (Chvála *et al.* 1972; Krčmar *et al.* 2010; Altunsoy & Kiliç 2012). En Crau, la deuxième espèce majeure est *A. quadrifarius* (28%). Cette espèce, qui privilégie les biotopes semi-désertiques, a une aire de répartition limitée au pourtour méditerranéen et au Moyen-Orient (Chvála *et al.* 1972; Müller *et al.* 2011). Les larves de *T. bromius* et d'*A. quadrifarius* sont semi-aquatiques et se développent dans la vase ou la terre humide autour des points d'eau. Ce sont des espèces « très agressives » (Rageau & Mouchet 1967).

En estive, *P. aprica* est l'espèce la plus abondante (38%). Cette espèce est très répandue en Europe notamment dans les zones vallonnées. Les larves sont plutôt terrestres et se développent dans la litière des forêts (Andreeva *et al.* 2009). Les *Hybomitra* spp. (*H. auripila*, *H. caucasica*, *H. montana* et *H. distinguenda*) représentent 26% des espèces collectées. Ces espèces sont souvent rencontrées en montagne. Les larves d'*Hybomitra* sp. sont généralement aquatiques à semi-aquatiques (tourbières, marais, bords des points d'eau) (Teskey 1969; Auroi 1983).

Haematopota pluvialis, enfin, est en faible proportion dans les collectes (7%) pourtant cette espèce représente près d'un quart des piqûres observées sur les vaches. C'est une espèce très commune en Europe, présente dans des biotopes variés, surtout à proximité des cours d'eau ou des milieux lenticules (gîtes larvaires) (Chvála *et al.* 1972; Krčmar 2004).

Les pièges Nzi (Mihok 2002) utilisés dans le cadre de la thèse se sont révélés très efficaces pour la capture des espèces moyennes à grandes (*T. bromius*, *P. aprica*, *Hybomitra* spp.) responsables de plus de 75% de la nuisance pour les vaches en estive. Pour *P. aprica*, le nombre quotidien de femelles capturées est d'ailleurs positivement corrélé au nombre quotidien de piqûres observées sur les bovins. En revanche, les collectes sous-estiment la présence des espèces plus petites, en particulier *H. pluvialis*. C'est pour cela que nous avons finalement peu d'informations sur la distribution spatiale et temporelle de cette espèce.

Nous avons observé une succession des espèces dominantes au cours de la saison estivale (*H. auripila* émergeant fin juin suivi de *T. bromius* et *P. aprica*) et un pic d'abondance en juillet-août. Ce profil saisonnier est classiquement observé chez les taons et il est très lié aux conditions climatiques mais aussi à l'altitude et à l'exposition (Krčmar 2005b; Hackenberger *et al.* 2009; Altunsoy & Kiliç 2012). Par rapport aux collectes faites en plaine, l'activité des taons démarre beaucoup plus tardivement en montagne. Ainsi, *T. bromius* est très abondant fin juin sur la plaine de Crau (10 m) alors qu'il est très abondant début août dans les estives de la Mouline et de Mantet (>1500 m). Par ailleurs, en estive, l'altitude influence positivement *H. auripila* et négativement *T. bromius* et *P. aprica*. On peut ainsi définir des zones plus ou moins à risques en fonction de l'émergence des principales espèces et de leur distribution. En début d'été, *H. auripila* est surtout abondant dans les zones de haute altitude (>1800 m) alors qu'en milieu d'été, *T. bromius* et *P. aprica* sont surtout abondants dans les zones de moyenne altitude (≤ 1800 m). De plus, les zones fragmentées milieux ouverts – forêts sont particulièrement favorables à *T. bromius* et *P. aprica* car elles rassemblent les principaux habitats nécessaires au cycle de vie des taons : des milieux humides pour les gîtes larvaires, du couvert végétal pour les sites de repos et des espaces dégagés qui facilitent la localisation des hôtes (Kingston *et al.* 1986; Barros 2001; Andreeva *et al.* 2009).

Les collectes de taons au moyen de pièges Nzi fixes et disposés selon un gradient altitudinal ont donc permis de suivre l'abondance des principales espèces au cours de la saison et d'identifier des habitats préférentiels. Cependant, afin de mieux caractériser la nuisance des taons, il était important de suivre leur activité autour d'un troupeau de bovins, par l'observation directe des piqûres et par la collecte d'insectes à l'aide de pièges Nzi mobiles et disposés à proximité des animaux.

Il est ainsi apparu que la nuisance des taons était relativement constante entre 10h et 16h alors que les suivis journaliers avaient montré un pic d'activité pour les principales espèces entre 11h et 13h (GMT+1). Seules les femelles *H. pluvialis* sont significativement moins actives le matin (Chvála *et al.* 1972). Les conditions climatiques conjointement au moment de la journée sont les déterminants qui conditionnent l'activité de piqûre des femelles (Van Hennekeler *et al.* 2011). De plus, en montagne, l'influence des vents thermiques semble être un facteur décisif (Chvála 1979). Les espèces réagissent aussi différemment aux variations des conditions climatiques. L'activité des espèces moyennes à grandes (Tabanini, Diachlorini) est surtout influencée par le vent et l'humidité alors que celle des espèces petites (Haematopini) est surtout influencée par la température.

L'altitude, quant à elle, a un effet modéré sur le nombre de piqûres des taons et cet effet s'explique par son influence sur les variables météorologiques (Körner 2007). En revanche, la structure paysagère forêts – milieux ouverts n'a aucune influence sur la nuisance. Les taons ont une grande capacité de vol qui leur permet de rechercher des hôtes sur de vastes étendues, particulièrement les espèces de taille moyenne à grande (*P. aprica*, *T. bromius* et *Hybomitra* spp.) (Konstantinov 1993). De plus, un troupeau constitue une entité très attractive pour des femelles à jeun.

Il semble donc difficile pour les animaux d'éviter les piqûres de taons dans les estives compte-tenu de la distribution et de l'activité des principales espèces. On peut considérer que la nuisance est maximale lors du pic d'abondance des espèces majoritaires (*T. bromius* et *P. aprica*) et lors des journées favorables à leur activité (vent et humidité faibles).

4.1.2. Implications dans la transmission de la besnoitiose bovine

Afin d'évaluer le rôle potentiel des taons comme vecteurs mécaniques d'agents pathogènes, il est nécessaire de bien connaître leur comportement de piqûre mais aussi leurs préférences trophiques (Magnarelli 1985). Les principales espèces nuisantes identifiées dans les estives pyrénéennes ont déjà été impliquées dans la transmission mécanique de différents pathogènes suite à des infections expérimentales : *T. bromius* (*Anaplasma marginale*, *Bacillus anthracis*, *Brucella* sp., *Erysipelothrix rhusopathiae* et *Francisella tularensis*), *H. montana* (*A. marginale* et *Brucella* sp.) et *H. pluvialis* (*A. marginale*, *B. anthracis*, *Brucella* sp., *E. rhusopathiae*, *F. tularensis*, *Trypanosoma theileri* et virus du BVD, bovine viral diarrhoea) (Krinsky 1976; Bose *et al.* 1987; Tarry *et al.* 1991). Seul le rôle vecteur de *P. aprica* n'a jamais été évalué. Or, de par sa taille, cette espèce pourrait être considérée comme un bon vecteur mécanique (changement d'hôtes plus fréquent chez les grandes espèces, pièces buccales plus contaminées) (Foil 1989). La transmission mécanique de l'agent de la besnoitiose bovine, *Besnoitia besnoiti*, a été démontré chez des espèces afrotropicales (Bigalke 1968), mais aucun résultat d'étude de transmission expérimentale avec des espèces paléarctiques n'a été publié.

Les pièges Nzi installés dans les estives en 2011 ont permis de collecter 2,4% de femelles gorgées. Ce résultat apparaît satisfaisant au regard de la difficulté à collecter, chez les diptères hématophages, des individus gorgés. Le piégeage permet, en effet, de collecter beaucoup d'insectes mais une faible proportion d'individus gorgés tandis que les captures manuelles, avec filet ou aspirateur, dans les sites de repos permettent d'obtenir une plus grande proportion d'individus gorgés mais seulement un petit nombre d'insectes (Friesen & Johnson 2013).

La proportion de repas identifiés a été très satisfaisante (~90%). Les femelles *T. bromius* se sont gorgées principalement sur vache, les femelles *H. auripila* sur sanglier et vache, et les femelles *P. aprica* sur cerf et vache. Aucun repas de sang sur petits ongulés sauvages n'a été détecté (résultat confirmé dans le parc animalier). La diversité des hôtes identifiés en estive et la détection de repas mixtes (2 double repas pour *T. bromius*, 1 en estive et 1 dans le parc animalier) montrent que *T. bromius* et *H. auripila* ont un comportement opportuniste pour les mammifères de grande taille (les bovins étant majoritaires dans les estives). Les troupeaux bovins n'étant pas présents

dans les zones les plus hautes en début d'été, les femelles *H. auripila* se sont nourries sur sanglier. Les femelles *P. aprica* ont, elles, montré une certaine préférence pour le cerf (67% des repas identifiés).

Globalement les cerfs sont apparus comme une source importante de sang pour les taons dans les estives (40% des repas identifiés, équivalent à la proportion de repas sur vache). Or, depuis 50 ans, les densités et les taux d'occupation des cerfs ont nettement augmenté en France et dans les autres pays d'Europe (Burbaité & Csányi 2010; ONCFS 2012). L'augmentation du nombre de cerfs associée à l'expansion des forêts d'altitude (Gracia *et al.* 2011) pourrait favoriser l'augmentation des populations de taons dans les estives durant les prochaines années. On remarquera d'ailleurs que *P. aprica* a représenté plus de la moitié des insectes capturés en 2011. Actuellement, le rôle des ongulés sauvages dans l'épidémiologie de la besnoitiose bovine est mal connu (Jacquet *et al.* 2010). Une enquête sérologique menée dans les Pyrénées espagnoles a montré une circulation de *Besnoitia* sp. chez les cerfs et les chevreuils mais la présence de *Besnoitia besnoiti* n'a été confirmée que chez un seul individu de chaque espèce (Gutiérrez-Expósitoa *et al.* 2013).

D'après les profils trophiques, il apparaît que les principales espèces de taons en estive sont des vecteurs potentiels de *Besnoitia besnoiti* chez les bovins et que *P. aprica* pourrait jouer un rôle important dans la circulation des *Besnoitia* sp. chez les cerfs. Cependant, la transmission de *Besnoitia* sp. entre bovins et cerfs semble anecdotique. En effet, les cerfs et les bovins ne partagent pas la même ressource au même moment (Kuiters *et al.* 2005). De plus, aucun repas de sang mixte vache-cerf n'a été détecté. La transmission mécanique est donc privilégiée entre les individus d'une même espèce puisqu'une femelle dont le repas est interrompu retourne sur le même hôte ou sur un hôte situé à proximité (Desquesnes *et al.* 2009).

4.2. Protection des troupeaux dans les espaces naturels protégés

En estive, les principales espèces nuisantes sont *T. bromius*, *P. aprica*, *Hybomitra* spp. et *H. pluvialis*. Les larves de ces espèces se développent dans des milieux différents, aquatiques à terrestres. Sans doute la grande disponibilité en hôtes permet-elle aux femelles de subvenir

aisément à leurs besoins nutritionnels et reproducteurs. Il semble ainsi difficile d'intervenir sur les gîtes larvaires à la fois multiples et disséminés, ou d'éliminer les taons adultes à grande échelle et de manière durable. Il convient donc de privilégier des méthodes de protection afin de réduire le nombre de piqûres sur les animaux. Cependant, la mise en place de telles mesures est souvent compliquée dans la pratique, par la dispersion du bétail et/ou le manque de contention des animaux. Le contrôle des populations de taons doit donc être envisagé à travers une approche intégrée couplant différentes méthodes de lutte : méthodes chimiques, outils mécaniques, approches biologiques, conduites d'élevage, gestion des habitats... Plusieurs d'entre elles ont déjà été testées avec plus ou moins de succès. Nos résultats permettent d'en évaluer la pertinence dans le contexte des estives méditerranéennes.

4.2.1. Lutte biologique

Dans tout écosystème, les espèces sont soumises à la prédation comme facteur régulateur et les Tabanidae ne font pas exception à la règle (Johnson & Hays 1973). De nombreux prédateurs vertébrés et invertébrés consomment des taons à l'état adulte, larvaire et d'œufs (Jackson & Wilson 1965; Johnson & Hays 1973; Cuisance *et al.* 1994). Les principaux prédateurs des femelles adultes sont des guêpes de la sous-famille des Bembicinae (Tribu Nissonini) (Roberts & Wilson 1967; Raymond 1989). Quand ces guêpes sont actives autour du bétail, le nombre d'attaques de taons diminue sensiblement. Malheureusement, leur habitat larvaire est très spécifique et leur activité saisonnière est beaucoup plus courte que celle des taons (Foil & Hogsette 1994).

Les œufs et les nymphes de taons peuvent aussi être parasités par des hyménoptères parasitoïdes. Au Texas (USA), l'utilisation de pontes naturellement parasitées avec *Telenomus emersoni* a montré des résultats encourageants dans la lutte contre les taons (Cuisance *et al.* 1994).

Différents types d'agents pathogènes ont également été observés chez les taons, en particulier les larves, avec des effets plus ou moins létaux : des nématodes (Mermithidae) (Poiner 1985), des champignons (*Cæломomyces milkoi*) (Andreeva 1976), des protozoaires et des spiroplasmes (Clark *et al.* 1984; Legoff *et al.* 1991).

La diversité des habitats larvaires d'une part, l'hétérogénéité et la complexité des conditions environnementales propres aux estives d'autre part rendent peu envisageable cette approche qui nécessite une parfaite connaissance de la biologie de l'espèce auxiliaire et de son écologie dans les écosystèmes auxquels elle est destinée. D'ailleurs, si les essais cités précédemment n'ont pas abouti à des applications usuelles, une approche biologique contre les diptères nuisants est le plus souvent opérationnelle dans les élevages confinés (Birkemoe *et al.* 2009).

4.2.2. Interventions sur les habitats

4.2.2.1. Aménagement des habitats

La lutte contre les taons peut être localement efficace en modifiant les habitats favorables à l'oviposition et au développement des larves par du drainage, par l'assèchement de zones humides, par du débroussaillage près des berges ou encore par la suppression des effluents d'étables (Cuisance *et al.* 1994). Anderson & Keen (1969) ont démontré qu'une retenue d'eau temporaire sur les marais salants au moment de la pupaison pouvait permettre de réduire les populations de taons. Au New-Jersey, où *Chrysops atlanticus* est très actif en lisière de forêt (Hansens & Rabin 1981), le déboisement et le débroussaillage ont permis de contrôler le nombre de femelles en limitant les sites de repos et d'oviposition (Foil & Hogsette 1994).

Les espaces naturels sensibles font l'objet de plans ou de modalités de gestion prenant en compte, à des degrés divers les enjeux agricoles et les problématiques conservatoires à l'échelle des territoires. Nécessairement, cette gestion repose sur des mesures et des dispositifs particuliers (protections réglementaires, plan de gestion, documents d'objectifs ou DOCOB pour les sites Natura 2000, mesures agroenvironnementales territorialisées ou MAEt) autour desquels sera structurée l'action des différents opérateurs. Du point de vue des logiques d'acteurs, ces outils de gestion constituent très souvent des compromis entre les motivations des uns et des autres. En conséquence, toute nouvelle préconisation d'aménagement qui n'entrerait pas dans le cadre formel de ces outils de gestion a très peu de chance de pouvoir être mise en œuvre. Concernant la lutte contre les taons, des mesures d'aménagement des habitats ne semblent donc envisageables que dans des zones de nuisance extrême, ce que ne sont pas les estives méditerranéennes.

4.2.2.2. Traitements insecticides dans l'environnement

La pulvérisation d'insecticides à grande échelle a été utilisée contre les larves et les adultes en Afrique et aux États-Unis (Foil & Hogsette 1994). Dans le New-Jersey (USA), la pulvérisation de pyréthrinoïdes (resméthrine et perméthrine) à faibles doses sur la végétation a montré une baisse temporaire (24h) de la nuisance, sans doute liée à la fuite des femelles *Chrysops atlanticus* vers des zones non traitées (Hansens 1981).

En France, la pulvérisation de Bti (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*) est la seule méthode utilisée en routine pour la lutte anti-larvaire contre les moustiques (EID Atlantique 2013) et l'usage d'insecticides anti-adulte est réservé « aux situations de nuisances très importantes ou en cas de risque épidémique » (Circulaire DPPR/DGS/DGT0 du 21 juin 2007). Les expériences précitées, et leur éventuelle généralisation comme moyen de lutte, sont donc totalement inenvisageables actuellement. Concernant le Bti, outre le fait que son efficacité n'a jamais été évaluée contre les taons, ce larvicide biologique est rendu inutilisable par l'inaccessibilité des gîtes larvaires.

4.2.3. Application d'insecticides sur les animaux

En France, les insecticides sont le principal outil de lutte contre les diptères hématophages. Plusieurs molécules ont été testées contre les taons avec des efficacités variables. Des bovins traités par pulvérisation avec un mélange de pyréthrine et de pipéronyl butoxide ont été protégés contre *T. sulcifrons* pendant trois à cinq jours (Bruce & Decker 1951). Lors d'un essai de comparaison de différents insecticides, Presley & Russel (1986) ont montré que l'application de perméthrine 1% en pour-on permettait une protection contre *T. abactor* pendant au moins deux semaines, avec une mortalité supérieure à 75%. Sous-forme de boucles auriculaires, la même perméthrine était efficace plus tard, entre la 2^{ème} et la 3^{ème} semaine, avec des mortalités respectives constatées de 79% et 54%. Ce délai est sans doute dû à la diffusion progressive du produit sur le corps de l'animal. Dans cette expérience, les taux de mortalité constatés avec la perméthrine ont toujours été nettement supérieurs à ceux observés avec les autres insecticides testés, que ce soit en pulvérisation ou sous-forme de boucles auriculaires (mortalités toujours inférieures à 40%). Des boucles auriculaires de perméthrine 10% ont permis de protéger des

chevaux contre les piqûres de *H. dissimilis* pendant un à deux mois (Parashar *et al.* 1989). Des pulvérisations de fenvalérate à 0,01% et 0,02% sur des bovins ont entraîné, respectivement, des taux de mortalité de *Tabanus* sp. de 67% et 79% (Leprince *et al.* 1991). Enfin, dans le cadre d'une campagne de lutte contre les trypanosomoses animales, l'application mensuelle de cyperméthrine en pour-on sur des bovins a entraîné une réduction de la densité apparente de *G. pallidipes* mais aussi de Tabanidae (Leak *et al.* 1995).

La variabilité des résultats observés est probablement liée aux molécules utilisées, aux modes d'application des produits et aux espèces ciblées (sensibilité, comportement de piqûre). Mais le manque d'efficacité d'un insecticide semble surtout lié à sa diffusion sur l'animal. En effet, la concentration de la molécule active n'est pas homogène sur tout le corps ; lorsque les produits sont utilisés en pour-on ou sous-forme de boucles auriculaires, les concentrations les plus faibles sont situées dans la région ventrale et sur les pattes (Stendel *et al.* 1992; Vale *et al.* 1999) qui sont des sites préférentiels de piqûre pour les taons. Du même coup se trouve réduite l'efficacité du produit et accru le risque de sélection de résistances aux pyréthrinoïdes qui ont, par ailleurs, été déjà documentées chez les stomoxes (Pitzer *et al.* 2010; Salem *et al.* 2012).

De plus, les bovins ont un comportement de léchage qui favorise l'ingestion des molécules appliquées sur la peau et leur élimination dans les fèces (Laffont *et al.* 2001). Bourn *et al.* (2005) ont estimé que 5 à 10% de la quantité totale de deltaméthrine appliquée en pour-on sur une vache était ingérée par léchage et que 1,6% était excrétée dans la bouse, ce qui induisait une toxicité pour la faune coprophile. Ainsi, dans une stratégie de lutte intégrée contre les glossines, la pulvérisation d'insecticides uniquement sur les zones piquées (pattes et mamelle) s'est avérée efficace, moins coûteuse et moins écotoxique dans la mesure où elle a permis d'appliquer une moindre quantité de produit.

Ce dernier mode d'application pourrait être adapté à la lutte contre les taons puisque ces insectes piquent majoritairement aux pattes et au pis. En outre, nous avons montré que l'activité des insectes était concentrée pendant une période relativement courte, de l'ordre de deux à trois semaines, au cœur de l'été. Une surveillance routinière du degré de nuisance pourrait permettre d'appliquer le traitement au moment opportun en se limitant à une unique application pour la

saison. Enfin, les petits ruminants et les jeunes bovins étant relativement peu piqués, le traitement pourrait être réservé aux bovins adultes (Schofield & Torr 2002; Mohamed-Ahmed & Mihok 2009).

Dans le contexte pastoral, un tel dispositif présente néanmoins un inconvénient majeur : au moment du traitement, puis ensuite chaque fois que les animaux se coucheront (ou se baigneront) une quantité non négligeable d'insecticide sera dispersée dans l'environnement (Gassner *et al.* 1997). Cette pollution diffuse se produira en outre au cœur de la saison d'activité de la plupart des espèces d'insectes. Des publications récentes ont montré que l'exposition des insectes à des doses non létales d'insecticides pouvait avoir un impact important sur leur comportement et sur la dynamique de leurs populations (Henry *et al.* 2012; Williamson et Wright 2013). Parallèlement, une érosion tendancielle de la biodiversité est actuellement visible en Europe, en particulier pour des insectes et dans des systèmes prairiaux (Biesmeijer *et al.* 2006; European Environment Agency 2013). Dans ces conditions, l'utilisation de biocides dans des systèmes extensifs au sein d'écosystèmes à forte biodiversité apparaît totalement inappropriée. En revanche, dans l'hypothèse où un traitement serait rendu obligatoire par la réglementation sanitaire, il serait opportun que cette obligation s'accompagne de recommandations strictes reprenant les modalités que nous venons de décrire.

4.2.4. Conduites d'élevage

Les mesures de conduites d'élevage qui assurent une protection des animaux contre les taons reposent sur deux grands principes : mettre à disposition des abris pour les animaux et/ou mener les animaux loin des habitats « à risques ».

4.2.4.1. Mise en place d'abris

Les taons sont peu enclins à entrer à l'intérieur des étables ou de tout autre type de bâtiments. Un abri même sommaire peut suffire à réduire le nombre des attaques (Raymond & Rousseau 1987). Plusieurs observations montrent que les taons préfèrent voler autour de barrières plutôt que passer par-dessus (Foil & Hogsette 1994). Une végétation dense et relativement haute peut ainsi constituer une barrière efficace contre les taons (Morgan & Lee 1977).

Roberts (1972) a observé que des femelles, attirées par un bœuf entouré d'une moustiquaire (hauteur = 2,4 m), volaient autour de la moustiquaire sans parvenir à atteindre l'animal. Des panneaux moustiquaires disposés autour des animaux peuvent donc constituer un bon outil de protection. De tels dispositifs, imprégnés d'insecticides, ont montré leur efficacité contre les moustiques et les mouches piqueuses en Afrique (Maia *et al.* 2010; Bauer *et al.* 2011).

Dans le cas des parcours d'estive, la mise en place d'abris semble d'un intérêt limité dans la mesure où les troupeaux allaitants sont souvent importants et très mobiles. Par ailleurs, les animaux peuvent se mettre naturellement à l'abri en profitant de la végétation arbustive. En revanche, dans des systèmes laitiers extensifs, où les effectifs sont moins importants et plus confinés à proximité des appareils de traite, des dispositifs de protection pourraient être installés.

4.2.4.2. Éviter les habitats « à risques »

L'étude de la distribution des taons dans les estives pyrénéennes a montré que les principales espèces étaient très abondantes dans les mosaïques paysagères constituées d'îlots boisés et de clairières. Ceci confirme les travaux de Sheppard & Wilson (1977) sur l'activité des taons en lisière de forêt. De plus, certaines espèces sont favorisées par des biotopes particuliers. Ainsi, les *Chrysops* spp. et les *Haematopota* spp. étaient-ils très présents autour du lac d'altitude d'Evol. Or, ces espèces sont surtout actives à proximité de leur gîtes larvaires (Chvála *et al.* 1972). Spontanément, les animaux s'éloignent des habitats forestiers ou se regroupent sur des collines exposées au vent durant les périodes de fortes pullulations de taons (Duncan & Cowtan 1980; Powell *et al.* 2006). La gestion des parcours pourrait ainsi permettre d'éloigner le bétail des habitats où les populations de taons sont les plus abondantes.

Dans les estives pyrénéennes parcourues par des troupeaux allaitants, une telle solution pourrait être utile en juillet – août. Elle impliquerait que, pendant les journées les plus chaudes, les troupeaux soient conduits dans les secteurs les plus hauts, à 200 mètres au moins des lisières forestières propices à *P. aprica* et *T. bromius*. L'activité de vol des insectes étant étroitement liée aux conditions météorologiques, les animaux pourraient redescendre à la faveur des changements de temps. Nos travaux sur le comportement de piqûre ayant été conduits durant des journées propices à l'activité des femelles, nous ne sommes malheureusement pas en mesure de définir les

seuils thermiques ou aérologiques à partir desquels les taons sont dans l'impossibilité de voler. La définition de préconisations de conduites visant à réduire la nuisance nécessiterait donc de mieux connaître la physiologie des espèces dominantes. De telles préconisations devraient également être confrontées aux contraintes pastorales (disponibilité en ressources fourragères, capacité de déplacement des troupeaux...) pour être intégrées dans une analyse systémique des parcours.

4.2.5. Stratégie « push-pull »

Les stratégies « push-pull » ont montré leur efficacité dans le contrôle des ravageurs de plantes et elles sont de plus en plus évaluées contre les diptères hématophages, comme par exemple *A. aegypti* en Thaïlande (Salazar *et al.* 2013). Le principe est, d'une part, de repousser (« push») les insectes à distance de leurs hôtes grâce à des molécules répulsives, et d'autre part, d'utiliser des dispositifs attractifs pour capturer (« pull ») les insectes (Logan & Birkett 2007).

4.2.5.1. Répulsifs

Les répulsifs sont des substances qui agissent localement ou à distance et qui empêchent l'insecte de s'approcher, de se poser ou de piquer (Stella Nerio *et al.* 2010). On distingue généralement les répulsifs synthétiques (N,N-diéthyl-3-méthylbenzamide (DEET), IR3535, Picaridine...) des répulsifs à base d'huiles essentielles (*Cymbopogon* spp., *Ocimum* spp., *Eucalyptus* spp...).

Du DEET appliqué sous forme de sprays aérosols à des concentrations élevés (75%) sur des vaches et des chevaux a montré une efficacité de 3h à 4h contre certaines espèces de taons. Mais des effets secondaires ont été observés après application sur les animaux : dermatite, exfoliation, hypersalivation (Palmer 1969; Blume *et al.* 1971). Du N,N-diéthyl-phénylacétamide et du phtalate de diméthyle ont aussi été utilisés en imprégnation sur des toiles de jute servant de couvertures à des vaches et à des mules pour les protéger contre les mouches et les taons (Rao 1987). La pulvérisation d'une émulsion d'oxamate 20% sur des vaches a démontré une action répulsive pendant 12h contre les taons (Minár *et al.* 1987). Plus récemment, Sünder *et al.* (2011) ont comparé un produit répulsif à base d'huiles essentielles "Bremsen-Frei-Plus" (Co. Dr. Schaette AG, Bad Waldsee, Germany) à un insecticide à base de perméthrine "Well-care

emulsion" (Co. Essex Tierarznei, München, Germany). Ces deux produits ont permis de protéger les chevaux contre moustiques, mouches et taons pendant près de 50h (Sünder *et al.* 2011). Les réactions de défense ont été moins fréquentes chez les chevaux traités avec la perméthrine.

En pratique, les répulsifs peuvent être appliqués directement sur les animaux mais d'autres dispositifs ont été testés chez les mouches piqueuses. Zhu *et al.* (2010) ont utilisé des granulés à base d'huile essentielle de *Nepeta cataria*, dispersés sur le fumier, pour protéger des jeunes bovins contre *S. calcitrans*. Toutefois, ce procédé est utilisable dans des parcs mais pas sur des pâtures. Bett *et al.* (2010) ont, quant à eux, testé l'efficacité de colliers équipés de diffuseurs pouvant être rechargés régulièrement en répulsif (2-méthoxy-4-méthylphénol) contre les glossines.

L'identification de composés répulsifs contre les taons faisait partie des objectifs initiaux de notre travail. Après quelques essais, il est rapidement apparu qu'il serait extrêmement difficile de soumettre les taons à des tests comportementaux au laboratoire et qu'il fallait réfléchir à un protocole facile à mettre en place sur le terrain. Chez les glossines, des pièges Epsilon et NG2G ont été utilisés pour tester l'effet répulsif du guaiacol (2-méthoxyphénol) et de molécules analogues (Torr *et al.* 1996; Saini & Hassanali 2007). Chez les taons, une seule expérience de ce type a été réalisée de manière fortuite par Hall *et al.* (1998). Un effet répulsif du « Swormlure-4 » (Mackley & Brown, 1984) – initialement utilisé pour attirer les Calliphoridae – a été observé sur les femelles taons d'après des collectes sur bandes adhésives noires (30x30 cm).

Après avoir montré, en cage de vol, l'efficacité répulsive de l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* sur *S. calcitrans* (Annexe 6), nous avons conçu et mis en place une expérience avec des pièges Nzi pour évaluer l'efficacité de différents répulsifs, dont l'huile essentielle de citronnelle, contre les taons en milieu naturel. Malheureusement, de mauvaises conditions météorologiques lors du printemps et de l'été 2013 nous ont contraints à interrompre l'expérience avant de pouvoir disposer de résultats exploitables.

L'usage des répulsifs est limité par leur grande volatilité et leur courte durée d'action (quelques heures le plus souvent). L'utilisation de ces composés dans des dispositifs opérationnels nécessiterait donc au préalable de mettre au point des procédés d'application permettant d'en

prolonger l'action (Bett *et al.* 2010). Des procédés d'encapsulation, de haute technicité, permettant la diffusion progressive de composés volatils ont déjà été développés par les industries cosmétique et textile. Malheureusement, il est à craindre que de telles techniques aient un coût difficilement conciliable avec les contraintes économiques de l'élevage extensif. L'alternative consisterait à pouvoir automatiser l'application du produit pour que les animaux puissent être efficacement protégés les jours de forte nuisance. Ceci est envisageable pour des troupeaux laitiers manipulés quotidiennement.

4.2.5.2. Pièges attractifs

Le principe du piégeage consiste à intercepter les insectes à la recherche d'un hôte en les attirant à l'intérieur de pièges grâce à des signaux visuels et olfactifs (Bouyer *et al.* 2005; Takken & Knols 2010). Il s'agit d'un outil efficace pour l'étude et la surveillance des vecteurs mais aussi pour la protection des hôtes et le contrôle des populations d'insectes. Pour les taons, différents types de pièges ont été mis au point afin d'améliorer leur attractivité (nombre de taons attirés) et leur efficacité (nombre de taons capturés parmi ceux qui sont attirés) (Encart 4).

Wilson (1968) a été le premier à tester la technique du piégeage comme outil de protection contre les taons. Il a montré une diminution des attaques sur le bétail grâce à l'installation autour d'un troupeau de pièges collants associés à une source de CO₂. Les populations de taons (majoritairement *T. lineola* et *T. fuscicostatus*) diminuaient pendant les 3-4 jours de piégeage, mais augmentaient à nouveau quelques jours après le retrait du dispositif. Deux études menées à grande échelle sur plusieurs années ont montré qu'un piégeage régulier pouvait permettre de réduire les populations de taons (Wall & Doane Jr 1980; Pavlova 1985). La première étude a été conduite près des marais salants du Massachusetts (USA) avec des « box trap », la deuxième dans les pâturages du Tioumen (Russie) avec des pièges Manitoba. Les deux études ont permis d'obtenir une diminution importante du nombre de taons collectés, respectivement, de 60% sur trois ans et de 77 à 92% sur six ans. Toutefois, aux Etats-Unis, l'élimination des populations de *T. nigrovittatus*, espèce la plus abondante, a été considérée comme impossible sur du long-terme, les femelles étant autogènes. Or, les pièges capturaient principalement des femelles à la recherche d'un hôte vertébré après leur première ponte (Wall & Doane Jr 1980).

En pratique, le piégeage autour des animaux a été peu évalué comme méthode de protection. Les pièges Nzi sont très attractifs pour les taons et leur efficacité a été évaluée à près de 45%, sans appât, pour des espèces afrotropicales (Mohamed-Ahmed *et al.* 2007). En France, les pièges Nzi se sont avérés très efficaces aussi bien en plaine qu'en montagne, spécifiquement pour les espèces moyennes à grandes. L'utilisation de pièges attractifs comme les pièges Nzi pourrait donc être envisagée dans les zones pastorales. Mais ces pièges peuvent capturer également des diptères pollinisateurs (syrphes, abeilles, papillons) et ainsi affecter la biodiversité du milieu.

Il est donc important d'optimiser les dispositifs de piégeages : attractivité, efficacité et spécificité. L'identification des molécules sémiocchimiques qui modulent les relations entre les taons et leurs hôtes est un moyen d'améliorer l'attractivité des pièges. Nous avons pu valider au cours de cette thèse un protocole EAG pour les taons. L'EAG est une première étape dans l'investigation des composés sémiocchimiques. Dans un second temps, les expérimentations sur le terrain grâce au piégeage doivent permettre de caractériser le comportement des taons en présence de différentes odeurs. Les expériences en tunnel de vol ont été très utilisées chez les stomoxes et les glossines (Schofield & Brady 1997; Jeanbourquin & Guerin 2007; Harraca *et al.* 2009) mais cette technique paraît peu envisageable chez les taons à cause de leur vol puissant (Nachtigall 2004).

Les techniques d'écologie chimique nous ont permis de mieux comprendre la sensibilité olfactive des taons et notamment les différences interspécifiques qui existent. Nos travaux ont montré que l'urine de cheval et certains de ses constituants phénoliques, en particulier le 4MP, sont des odeurs très actives sur les récepteurs cellulaires des antennes et très attractives sur le terrain, plus spécifiquement pour *A. quadrifarius*. Les urines d'ongulés ont également montré une forte attractivité chez d'autres espèces tempérées (Mihok & Mulye 2010; Krčmar & Lajos 2011). Nos résultats suggèrent que les molécules actives présentes dans les urines agissent en synergie. Or, Mihok & Lange (2012) ont déjà démontré un effet synergique entre l'ammoniaque et les phénols. Il serait intéressant de poursuivre les études sur les kairomones afin d'identifier de nouvelles molécules attractives et de les tester en association.

De plus, nous avons montré des différences entre *T. bromius* et *A. quadrifarius* concernant les réponses physiologiques et comportementales vis-à-vis des odeurs testées. Ces observations peuvent expliquer les différences de collectes entre *Tabanus* spp. et *Atylotus* spp. rencontrées en Croatie lors de piégeage avec des attractifs variés (Krčmar *et al.* 2010). Il semblerait en particulier que *T. bromius* soit plus sensible aux stimuli visuels et *A. quadrifarius* plus sensible aux stimuli olfactifs. De telles différences de sensibilité ont pu être observées entre différentes espèces de glossines (Torr & Solano 2010). D'un point de vue pratique, il est donc essentiel de connaître la sensibilité générale des espèces les plus communes (*P. aprica*, *H. pluvialis*...) afin d'adapter au mieux les dispositifs de protection des troupeaux. Le couplage d'attractifs sémiochimiques avec les attractifs visuels que constituent les pièges peut en effet augmenter considérablement les captures mais demeure plus complexe à mettre en œuvre.

Incontestablement, l'utilisation de pièges attractifs de type Nzi peut être envisagée comme une solution opérationnelle pour protéger les troupeaux au pâturage. Outre leur efficacité, que nos travaux n'ont fait que confirmer dans un contexte méditerranéen, ces pièges présentent deux avantages essentiels : leur simplicité d'utilisation et leur relative spécificité. Pour protéger le bétail contre un nombre limité d'espèces nuisantes dont l'abondance varie fortement au cours du temps et en fonction des milieux, ces pièges pourraient être mis en place, activés ou déplacés par l'éleveur ou le vacher en fonction de la gêne observée au cours de la saison d'estive. Selon la dispersion du troupeau un nombre limité de pièges peut être suffisant. Dans la perspective d'une utilisation dans des écosystèmes sensibles et protégés, la spécificité des pièges doit être évaluée avec précision. Les insectes « non cibles » capturés au cours de l'inventaire de 2011 ont d'ailleurs été conservés à cette fin et devront faire l'objet d'une analyse exhaustive.

Encart 4 : Pièges contre les Tabanidae



Figure A. Piège Canopy
(in <http://www.nzitrap.com>)



Figure B. Piège Nzi (L. puech, 2012)

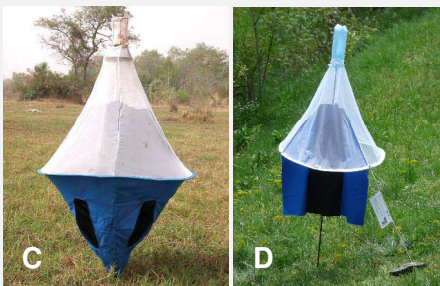


Figure C. Piège Biconique
(M. Desquesnes, 2005)

Figure D. Piège Vavoua
(P. Jay-Robert, 2011)



Figure E. Piège Tabanoid
(in <http://www.tabanoid.com>)

La première technique de capture a été adoptée pour les glossines au début du siècle. Il s'agissait de simples écrans noirs enduits de glue (Challier & Laveissière 1973). Puis, des véritables pièges « tridimensionnels » ont été mis au point pour lutter contre les glossines, mais aussi les stomoxes et les taons. Le piégeage est un outil efficace d'étude, de surveillance, de protection et de lutte vectorielle (Bouyer *et al.* 2005).

Il existe des pièges d'interception comme les pièges Malaise qui sont peu spécifiques et des pièges attractifs généralement plus spécifiques. Pour les mouches piqueuses, différents modèles sont utilisés : Canopy (Fig. A), Nzi (Fig. B), Tetra, NG2, Epsilon, biconique (Fig. C), Vavoua (Fig. D), pyramidal, écran-piège, Manitoba, Epps... (Mihok 2013; Thompson 1969; Challier & Laveissière 1973; Laveissière & Grebaut 1990; Hribar *et al.* 1991; Mihok 2002; Bouyer *et al.* 2005). Les types de pièges varient par la forme, la couleur et le matériel utilisé. Les pièges attractifs sont des leurres visuels auxquels est associée éventuellement une odeur attractive (Bouyer *et al.* 2005). Ces pièges collectent majoritairement des femelles à la recherche d'un hôte vertébré.

Les collectes de Tabanidae peuvent être très variables d'un piège à l'autre. Les pièges Nzi et les pièges Canopy ont été très utilisés ces dernières années pour la collecte de taons. Les pièges Nzi se sont révélés les plus efficaces. En Afrique, les collectes avec les deux types de pièges étaient similaires (Mihok 2002). En revanche, en Amérique du Nord, les pièges Nzi collectaient 5 fois plus de taons que les pièges Canopy (Mihok *et al.* 2006) et, en Australie, les pièges Nzi capturaient un plus grand nombre (x4,5) et une plus grande variété (x1,5) de taons que les pièges Canopy (Van Hennekeler *et al.* 2008).

Récemment, Horváth *et al.* (2008) ont montré que les taons étaient attirés par la lumière polarisée et ce comportement a été utilisé pour le développement de nouveaux types de pièges (Blahó *et al.* 2012b; Egri *et al.* 2013a; Egri *et al.* 2013b). Ces pièges permettent de collecter à la fois des mâles et des femelles. Une version commerciale, dénommée le piège Tabanoid, est d'ailleurs disponible (MFKK 2011) (Fig. E).

4.3. Perspectives

Dans la continuité des travaux de thèse, plusieurs axes de recherches se dégagent autour i) de la capacité des taons d'Europe à transmettre l'agent de la besnoitiose bovine dans la nature, ii) de l'efficacité du piégeage dans la protection des bovins, iii) et de l'implication de la vision et de l'olfaction dans la recherche d'hôtes chez les différentes espèces de taons.

Prédire le rôle des espèces dominantes de taons dans la transmission mécanique de *Besnoitia besnoiti*

Nos travaux en estive ont montré que seules quelques espèces abondantes devaient être considérées comme des espèces nuisibles. La capacité de ces espèces à transmettre mécaniquement *Besnoitia besnoiti* devrait être évaluée expérimentalement comme cela a été démontré par Bigalke (1968) avec des espèces afrotropicales de lapin à vache, ou entre vaches. Depuis, Liénard *et al.* (2013) ont mis au point un protocole avec des nourrisseurs artificiels qui a permis de montrer que *S. calcitrans* pouvait transmettre les parasites sur substrat artificiel à partir d'une génisse présentant une infection chronique de besnoitiose bovine. Un tel dispositif pourrait être adapté au mode de gorgement des femelles taons (Downer *et al.* 2007) pour étudier la capacité des principales espèces à transmettre *Besnoitia besnoiti*.

Parallèlement à cela, pour pouvoir prédire le rôle de chaque espèce dans l'épidémiologie de la besnoitiose, il est important de décrire plus précisément leur comportement de piqûre : repas de sang fréquemment interrompu ou pas, repas complet sur un même individu ou plusieurs repas partiels nécessaires, propension à changer d'individu... (Muzari *et al.* 2010b). Les résultats observés sur *T. bromius* (espèce abondante, longue période d'activité, repas mixte) font de cette espèce un vecteur potentiellement très efficace dans la nature.

Évaluer l'efficacité des pièges pour protéger les troupeaux

Les collectes menées dans un contexte de pâturage extensif typique de l'arrière-pays méditerranéen ont confirmé l'efficacité des pièges Nzi déjà démontrée à travers le monde (Mihok 2002; Mihok 2006; Van Hennekeler 2008). Toutefois, ce contexte n'est pas le plus propice pour évaluer la qualité de la protection offerte par les pièges. À la suite de nos travaux, une étude devrait donc être menée avec des animaux plus confinés (à l'intérieur d'une parcelle) et dans un

environnement plus homogène pour estimer l'effet du piégeage sur les populations de taons et sur la nuisance pour les bovins.

Une telle étude est en cours de réalisation à travers une thèse vétérinaire conduite dans les Alpes françaises autour d'un troupeau laitier. Le projet SANITEL a également été monté par l'Institut Ikare (Institut Karibéen et Amazonien de l'élevage) pour tester l'efficacité des pièges dans les élevages guyanais. Ces travaux devraient fournir des éléments pratiques sur l'intensité du piégeage à maintenir pour obtenir une protection minimale des animaux durant la période d'activité des taons.

Mieux comprendre les différences de sensibilité entre espèces

A travers l'étude de la physiologie olfactive de deux espèces de taons et de leurs réponses à des odeurs variées, il est apparu que des différences de sensibilité olfactive, mais aussi visuelle, pouvaient exister selon les espèces de Tabanidae. Comme chez les Glossinidae, l'importance de la vision et de l'olfaction semble ainsi variable d'une espèce à l'autre (Torr & Solano 2010). Récemment, il a été démontré que les rayures ou les taches sur le pelage d'un animal attiraient moins les taons qu'un pelage uniforme. Blahó *et al.* (2013) ont alors comparé l'attractivité d'une cible rayée associée à un attractif olfactif (CO₂ et/ou ammoniac) à une cible uniformément noire, avec ou sans le même attractif olfactif. Globalement, la cible rayée a toujours été moins attractive que la cible noire. Malheureusement les espèces de taons n'ont pu être identifiées au cours de cette expérience et il est impossible de dire si certaines espèces étaient plus ou moins sensibles aux différents stimuli. Il serait intéressant de renouveler ce type de d'expérimentation combinant des signaux visuels et olfactifs afin de mieux cerner la sensibilité des différentes espèces et l'importance de chaque sens mis en jeu dans la recherche d'hôtes, toujours dans l'optique d'optimiser et d'adapter les dispositifs de piégeages aux espèces les plus abondantes.

Références bibliographiques

- Angéniol, C. & Balloy, B. (2012) Le Pastoralisme – Des hommes au servives des produits et des territoires. *Chambres d'agriculture*, 1012, 30-38.
- Altunsoy, F. & Kiliç, A.Y. (2012). Seasonal Abundance of Horse Fly (Diptera: Tabanidae) in Western Anatolia. *Journal of the Entomological Research Society*, 14, 95-105.
- Alvarez-García, G., Frey, C.F., Mora, L.M. & Schares, G. (2013). A century of bovine besnoitiosis: an unknown disease re-emerging in Europe. *Trends in Parasitology*, doi: 10.1016/j.pt.2013.06.002.
- Alverson, D.R. & Noblet, R. (1977). Activity of female Tabanidae (Diptera) in relation to selected meteorological factors in South Carolina. *Journal of Medical Entomology*, 14, 197-200.
- Amano, K. (1985). Statistical analyses of the influence of meteorological factors on flight activity of female tabanids. *Kontyû, Tokyo*, 53, 161-172.
- Amano, K. (1991). A labor-saving rearing technique. *Japanese Journal of Sanitary Zoology*, 42, 319-322.
- Amsler, S. & Filledier, J. (1994). Attractivité pour les Tabanidae de l'association méta-crésol/octénol : Résultats obtenus au Burkina Faso. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, 47, 93-96.
- Anderson, J.F. & Kneen, F.R. (1969). The temporary impoundment of salt marshes for the control of coastal deer flies. *Mosquito News*, 29, 239-243.
- Andreeva, R.V. (1976). Study of *Coelomomyces milkoï* Dudka et Koval, pathogenic for the horsefly larvae. *Meditsinskaia parazitologija i parazitarnye bolezni*, 45, 212-218.
- Andreeva, V.R., Kilic, A.Y. & Altunsoy, F. (2009). New Contribution to Information about Tabanidae (Diptera) Adult and Larvae from West Anatolia. *Journal of the Entomological Research Society*, 11, 19-30.
- Andreyeva, R.V. (1982). On ecologo-morphological typing of tabanid larvae (Diptera, Tabanidae). *Entomological review*, 64, 49-54.
- Association Française de Pastoralisme (AFP) : un réseau (2013). Le pastoralisme en France [en ligne] <http://www.pastoralisme.net>.
- Auroi, C. (1983). Recherches sur l'écologie des Tabanidae et de *Hybomitra bimaculata* (Macquart) en particulier, dans une tourbière du haut Jura neuchâtelois. Université de Neuchâtel Neuchâtel, Suisse, p. 339.
- Barros, A.M. (2001). Seasonality and relative abundance of Tabanidae (Diptera) captured on horses in the Pantanal, Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 96, 917-923.
- Barros, A.T.M. & Foil, L.D. (2007). The influence of distance on movement of tabanids (Diptera : Tabanidae) between horses. *Veterinary Parasitology*, 144, 380-384.
- Bauer, B., Holzgreffe, B., Mahama, C.I., Baumann, M.P.O., Mehlitz, D. & Clausen, P.-H. (2011). Managing Tsetse Transmitted Trypanosomosis by Insecticide Treated Nets - an Affordable and Sustainable Method for Resource Poor Pig Farmers in Ghana. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 5. doi: 10.1371/journal.pntd.0001343.
- Baylis, M. (1996). Effect of defensive behaviour by cattle on the feeding success and nutritional state of the tsetse fly, *Glossina pallidipes* (Diptera: Glossinidae). *Bulletin of Entomological Research*, 86, 329-336.

- Bell, J.R., Aralimarad, P., Lim, K.-S. & Chapman, J.W. (2013). Predicting Insect Migration Density and Speed in the Daytime Convective Boundary Layer. *Plos One*, 8. doi: 10.1371/journal.pone.0054202.
- Bett, B., Randolph, T.F., Irungu, P., Nyamwaro, S.O., Kitala, P., Gathuma, J. *et al.* (2010). Field trial of a synthetic tsetse-repellent technology developed for the control of bovine trypanosomosis in Kenya. *Preventive Veterinary Medicine*, 97, 220-227.
- Beynon, S.A. (2012). Potential environmental consequences of administration of ectoparasiticides to sheep. *Veterinary Parasitology*, 189, 125-135.
- Beynon, S.A., Mann, D.J., Slade, E.M. & Lewis, O.T. (2012). Species-rich dung beetle communities buffer ecosystem services in perturbed agro-ecosystems. *Journal of Applied Ecology*, 49, 1365-1372.
- Biesmeijer J.C., Roberts, S.P.M., Reemer, M., Ohlemüller, R., Edwards, M., Peeters, T. *et al.* (2006). Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science*, 313, 351-354.
- Bigalke, R.D. (1968). New concepts on the epidemiological features of bovine besnoitiosis as determined by laboratory and field investigations. *The Onderstepoort journal of veterinary research*, 35, 3-137.
- Birkemoe, T., Soleng, A. & Aak, A. (2009). Biological control of *Musca domestica* and *Stomoxys calcitrans* by mass release of the parasitoid *Spalangia cameroni* on two Norwegian pig farms. *BioControl*, 54, 425-436.
- Blahó, M., Egri, A., Bahidszki, L., Kriska, G., Hegedus, R., Akesson, S. *et al.* (2012a). Spottier Targets Are Less Attractive to Tabanid Flies: On the Tabanid-Repellency of Spotty Fur Patterns. *Plos One*, 7. doi: 10.1371/journal.pone.0041138
- Blahó, M., Egri, A., Barta, A., Antoni, G., Kriska, G. & Horváth, G. (2012b). How can horseflies be captured by solar panels? A new concept of tabanid traps using light polarization and electricity produced by photovoltaics. *Veterinary Parasitology*, 189, 353-365.
- Blahó, M., Egri, A., Száz, D., Kriska, G., Akesson, S. & Horváth G. (2013) Stripes disrupt odour attractiveness to biting horseflies: battle between ammonia, CO₂, and colour pattern for dominance in the sensory systems of host-seeking tabanids. *Physiology and behaviour*, 119, 168-174.
- Blume, R.R., Roberts, R.H., Eschle, J.L. & Matter, J.J. (1971). Tests of aerosols of Deet for protection of livestock from biting flies. *Journal of Economic Entomology*, 64, 1193-1196.
- Bolker, B.M., Brooks, M.E., Clark, C.J., Geange, S.W., Poulsen, J.R., Stevens, M.H.H. *et al.* (2009). Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 24, 127-135.
- Bose, R., Friedhoff, K.T., Olbrich, S., Buscher, G. & Domeyer, I. (1987). Transmission of *Trypanosoma theileri* to cattle by Tabanidae. *Parasitology Research*, 73, 421-424.
- Bourn, D., Grant, I., Shaw, A. & Torr, S. (2005). Cheap and safe tsetse control for livestock production and mixed farming in Africa. *Aspects of Applied Biology*, 75. [en ligne] <http://teca.fao.org/read/4515>.
- Bouyer, J., Desquesnes, M., Kaboré, I., Dia, M.L., Gilles, J., Yoni, W. *et al.* (2005). Fiche technique 20 : Le piégeage des insectes vecteurs. CIRAD, p. 12. [en ligne] <http://www.cirdes.org/spip.php?article37>.
- Browne, S.M. & Bennett, G.F. (1980). Color and shape as mediators of host-seeking responses of simuliids and tabanids (Diptera) in the Tantramar marshes, New Brunswick, Canada. *Journal of Medical Entomology*, 17, 58-62.

- Bruce, T.J.A., Wadhams, L.J. & Woodcock, C.M. (2005). Insect host location: a volatile situation. *Trends in Plant Science*, 10, 269-274.
- Bruce, W.N. & Decker, G.C. (1951). Tabanid control on dairy and beef cattle with synergized pyrethrins. *Journal of Economic Entomology*, 44, 154-159.
- Burbaité, L. & Csányi, S. (2010). Red deer population and harvest changes in Europe. *Acta Zoologica Lituanica*, 20, 179-188.
- Burnett, A.M. & Hays, K.L. (1974). Some influences of meteorological factors on flight activity of female horse flies (Diptera: Tabanidae). *Environmental entomology*, 3, 515-521.
- Cameron, A.E. (1932). The rearing of *Haematopota pluvialis* Linné (Cleg, Tabanidae) under controlled experimental conditions. *Nature*, 130, 94-95.
- Challier, A. & Laveissière, C. (1973). Un nouveau piège pour la capture des glossines (*Glossina*: Diptera, Muscidae): description et essais sur le terrain. *Cahier de l'O.R.S.T.O.M., série Entomologie Médicale et Parasitologie*, XI, 251-262.
- Chvála, M. (1979). Daily activity of Tabanidae in the Caucasus. *Angewandte Parasitologie*, 20, 38-45.
- Chvála, M., Lyneborg, L. & Moucha, J. (1972). *The horse flies of Europe (Diptera, Tabanidae)*. Entomological Society of Copenhagen. p. 499.
- Cilek, J.E. & Olson, M.A. (2008). Effects of carbon dioxide, an octenol/phenol mixture, and their combination on Tabanidae (Diptera) collections from French 2-tier box traps. *Journal of Medical Entomology*, 45, 638-642.
- Circulaire DPPR/DGS/DGT0 du 21 juin 2007 relative aux méthodes de lutte contre les moustiques et notamment à l'utilisation de produits insecticides dans ce cadre (et cas particulier de produits à base de temephos)
- Clark, T.B., Peterson, B.V., Whitcomb, R.F., Henegar, R.B., Hackett, K.J. & Tully, J.G. (1984). Spiroplasmas in the Tabanidae. *Israel Journal of Medical Sciences*, 20, 1002-1005.
- Colebrook, E. & Wall, R. (2004). Ectoparasites of livestock in Europe and the Mediterranean region. *Veterinary Parasitology*, 120, 251-274.
- Cook, S.M., Khan, Z.R. & Pickett, J.A. (2007). The use of push-pull strategies in integrated pest management. *Annual Review of Entomology*, 52, 375-400.
- Cooksey, L.M. & Wright, R.E. (1987). Flight range and dispersal activity of the host-seeking horse fly, *Tabanus abactor* (Diptera, Tabanidae), in north central Oklahoma. *Environmental Entomology*, 16, 211-217.
- Cuisance, D., Barre, N. & Dedeken, R. (1994). Ectoparasites des animaux : méthodes de lutte écologique, biologique, génétique et mécanique. *Revue Scientifique Et Technique De L'Office International Des Epizooties*, 13, 1305-1356.
- Dale, W.E. & Axtell, R.C. (1975). Flight of the salt marsh Tabanidae (Diptera), *Tabanus nigrovittatus*, *Chrysops atlanticus* and *C. fuliginosus*: correlation with temperature, light, moisture and wind velocity. *Journal of Medical Entomology*, 12, 551-557.
- de Bruyne, M. & Baker, T.C. (2008). Odor detection in insects: Volatile codes. *Journal of Chemical Ecology*, 34, 882-897.
- DeFoliart, G.R. & Morris, C.D. (1967). A dry ice-baited trap for collection and field storage of hematophagous diptera. *Journal of Medical Entomology*, 4, 360-362.
- DeGiusti, D.L., Sterling, C.R. & Dobrzecch, D. (1973). Transmission of chelonian haemoproteid *Haemoproteus metchnikovi* by a tabanid fly *Chrysops callidus*. *Nature*, 242, 50-51.
- Den Otter, C.J., Tchicaya, T. & Van den Berg, M.J. (1988). Olfactory sensitivity of five species of tsetse (*Glossina* spp.) to 1-octen-3-ol, 4-heptanone, 3-nonanone and acetone. *Insect Science and its Application*, 9, 213-218.

- Desquesnes, M., Biteau-Coroller, F., Bouyer, J., Dia, M.L. & Foil, L. (2009). Development of a mathematical model for mechanical transmission of trypanosomes and other pathogens of cattle transmitted by tabanids. *International Journal for Parasitology*, 39, 333-346.
- Djiteye, A., Diarra, M., Ouattara, I. & Traore, D. (1998). Comparison of the efficacy of different traps and attractants for Tabanidae and *Stomoxys* in Mali. *Journal of Protozoology Research*, 8, 263-273.
- Dolin, V.G. & Andreeva, R.V. (1983). Ecology and morphology of *Tabanus infestus* (Tabanidae). *Parazitologiya*, 17, 304-307.
- Dormont, L., Jay-Robert, P., Bessiere, J.-M., Rapior, S. & Lumaret, J.-P. (2010). Innate olfactory preferences in dung beetles. *Journal of Experimental Biology*, 213, 3177-3186.
- Downer, K.E., Nachman, R.J. & Stoffolano, J.G., Jr. (2007). Factors affecting engorgement behavior in the salt marsh horse fly, *Tabanus nigrovittatus* macquart (Diptera : Tabanidae). *Journal of Insect Behavior*, 20, 403-412.
- Duffy, J.E. (2009). Why biodiversity is important to the functioning of real-world ecosystems. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 7, 437-444.
- Duncan, P. & Cowtan, P. (1980). An unusual choice of habitat helps Camargue horses to avoid blood-sucking horse-flies. *Biology of Behaviour*, 5, 55-60.
- Duncan, P. & Vigne, N. (1979). Effect of group-size in horses on the rate of attacks by blood-sucking flies. *Animal Behaviour*, 27, 623-625.
- Dusbabek, F. (1986). [Composition and seasonal dynamics of the horse-flies fauna (Tabanidae) in a future flood region of Hnevkovice Dam Lake]. *Dipterologica bohemoslovaca*, IV, 91-93.
- Egri, A., Blahó, M., Szaz, D., Barta, A., Kriska, G., Antoni, G. *et al.* (2013a). A new tabanid trap applying a modified concept of the old flypaper: Linearly polarising sticky black surfaces as an effective tool to catch polarotactic horseflies. *International Journal for Parasitology*, 43, 555-563.
- Egri, A., Blahó, M., Szaz, D., Kriska, G., Majer, J., Herczeg, T. *et al.* (2013b). A horizontally polarizing liquid trap enhances the tabanid-capturing efficiency of the classic canopy trap. *Bulletin of Entomological Research*, <http://dx.doi.org/10.1017/S0007485313000357>.
- EID Atlantique (2013). Le Bti, un larvicide biologique [en ligne] <http://www.eidatlantique.eu>.
- Esteban, P., Ninyerola, M. & Prohom, M. (2009). Spatial modelling of air temperature and precipitation for Andorra (Pyrenees) from daily circulation patterns. *Theoretical and Applied Climatology*, 96, 43-56.
- European Environment Agency (2013). The European Grassland Butterfly Indicator: 1990-2011, EEA Technical report 11/2013, p. 34.
- Foil, L.D. (1989). Tabanids as vectors of disease agents. *Parasitology Today*, 5, 88-96.
- Foil, L.D., Adams, W.V., McManus, J.M. & Issel, C.J. (1987). Bloodmeal residues on mouthparts of *Tabanus fuscicostatus* (Diptera, Tabanidae) and the potential for mechanical transmission of pathogens. *Journal of Medical Entomology*, 24, 613-616.
- Foil, L.D. & Hogsette, J.A. (1994). Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies. *Revue Scientifique et Technique*, 13, 1125-1158.
- French, F.E. & Kline, D.L. (1989). 1-octen-3-ol, an effective attractant for Tabanidae (Diptera). *Journal of Medical Entomology*, 26, 459-461.
- Friesen, K.M. & Johnson, G.D. (2013) Evaluation of methods for collecting blood-engorged mosquitoes from habitats within a wildlife refuge. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 29, 102-107.

- Ganeva, D. (1999). Daily activity of *Tabanus bromius* L., *Tabanus tergustinus* Egg. and *Haematopota pluvialis* L. (Tabanidae, Diptera) in the Stara Zagora district. *Periodicum Biologorum*, 101, 215-220.
- Garros, C., Gardes, L., Allene, X., Rakotoarivony, I., Viennet, E., Rossi, S. *et al.* (2011). Adaptation of a species-specific multiplex PCR assay for the identification of blood meal source in Culicoides (Ceratopogonidae: Diptera): applications on Palaearctic biting midge species, vectors of Orbiviruses. *Infection Genetics and Evolution*, 11, 1103-1110.
- Gassner, B., Wuthrich, A., Lis, J., Scholtysik, G. & Solioz, M. (1997). Topical application of synthetic pyrethroids to cattle as a source of persistent environmental contamination. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 32, 729-739.
- Gibson, G. & Torr, S.J. (1999). Visual and olfactory responses of haematophagous Diptera to host stimuli. *Medical and Veterinary Entomology*, 13, 2-23.
- Gouteux, J.P., Noireau, F. & Staak, C. (1989). The host preferences of *Chrysops silacea* and *Chrysops dimidiata* (Diptera, Tabanidae) in an endemic area of *Loa loa* in the Congo. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 83, 167-172.
- Gracia, M., Meghelli, N., Comas, L. & Retana, J. (2011). Land-cover changes in and around a National Park in a mountain landscape in the Pyrenees. *Regional Environmental Change*, 11, 349-358.
- Green, C.H. & Flint, S. (1986). An analysis of color effects in the performance of the F2 trap against *Glossina pallidipes* Austen and *G. morsitans morsitans* Westwood (Diptera, Glossinidae). *Bulletin of Entomological Research*, 76, 409-418.
- Gutierrez, C., Desquesnes, M., Touratier, L. & Buscher, P. (2010). *Trypanosoma evansi*: Recent outbreaks in Europe. *Veterinary Parasitology*, 174, 26-29.
- Gutiérrez-Expósito, D., Ortega-Moraa, L.M., Marcob, I., Boadellac, M., Gortázarc, C., San Miguel-Ayanzd, J.M. *et al.* (2013). First serosurvey of *Besnoitia* spp. infection in wild European ruminants in Spain. *Veterinary Parasitology*, doi: 10.1016/j.vetpar.2013.05.017
- Hackenberger, B.K., Jarić, D. & Krčmar, S. (2009). Distribution of tabanids (Diptera: Tabanidae) along a two-sided altitudinal transect. *Environmental Entomology*, 38, 1600-1607.
- Hall, D.R., Beevor, P.S., Cork, A., Nesbitt, B.F. & Vale, G.A. (1984). 1-Octen-3-ol. A potent olfactory stimulant and attractant for tsetse isolated from cattle odours. *Insect Science and its Application*, 5, 335-339.
- Hall, M.J.R., Farkas, R. & Chainey, J.E. (1998). Use of odour-baited sticky boards to trap tabanid flies and investigate repellents. *Medical and Veterinary Entomology*, 12, 241-245.
- Hans, A., Poncon, N. & Zientara, S. (2012). Epidemiology of equine infectious anemia in France and in Europe from 1994 to 2011. *Bulletin De l'Académie Vétérinaire De France*, 165, 27-34.
- Hansens, E.J. (1979). Tabanidae of the east coast as an economic problem: review. *Journal of the New York Entomological Society*, 87, 312-318.
- Hansens, E.J. (1981). Resmethrin and permethrin sprays to reduce annoyance from a deer fly, *Chrysops atlanticus* (Diptera, Tabanidae). *Journal of Economic Entomology*, 74, 3-4.
- Hansens, E.J. & Rabin, J. (1981). Deer fly, *Chrysops atlanticus* Pechuman (Diptera, Tabanidae), activity in cultivated fields and nearby salt-marsh breeding places. *Environmental Entomology*, 10, 590-592.
- Harley, J.M.B. (1965). Seasonal abundance and diurnal variations in activity of some *Stomoxys* and Tabanidae in Uganda. *Bulletin of Entomological Research*, 56, 319-332.

- Harraca, V., Syed, Z. & Guerin, P.M. (2009). Olfactory and behavioural responses of tsetse flies, *Glossina* spp., to rumen metabolites. *Journal of Comparative Physiology a-Neuroethology Sensory Neural and Behavioral Physiology*, 195, 815-824.
- Hatfield, R.G. & LeBuhn, G. (2007). Patch and landscape factors shape community assemblage of bumble bees, *Bombus* spp. (Hymenoptera : Apidae), in montane meadows. *Biological Conservation*, 139, 150-158.
- Hawkins, A., J., Adams, W.V., Jr, Wilson, B.H., Issel, C.J. *et al.* (1976). Transmission of equine infectious anemia virus by *Tabanus fuscicostatus*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 168, 63-64.
- Hayes, R.O., Doane, O.W., Sakolsky, G. & Berrick, S. (1993). Evaluation of attractants in traps for greenhead fly (Diptera: Tabanidae) collections on a Cape Cod, Massachusetts, salt marsh. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 9, 436-440.
- Henry, M., Beguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J.-F., Aupinel, P. *et al.* (2012). A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. *Science*, 336, 348-350
- Hess, A.D., Hayes, R.O. & Tempelis, C.H. (1968). Use of forage ratio technique in mosquito host preferences studies. *Mosquito News*, 28, 386-389.
- Hodkinson, I.D. (2005). Terrestrial insects along elevation gradients: species and community responses to altitude. *Biological Reviews*, 80, 489-513.
- Hollander, A.L. & Wright, R.E. (1980). Impact of tabanids (Diptera: Tabanidae) on cattle: blood meal size and preferred feeding sites. *Journal of Economic Entomology*, 73, 431-433.
- Horvath, G., Majer, J., Horvath, L., Szivak, I. & Kriska, G. (2008). Ventral polarization vision in tabanids: horseflies and deerflies (Diptera : Tabanidae) are attracted to horizontally polarized light. *Naturwissenschaften*, 95, 1093-1100.
- Horváth, G., Blahó, M., Kriska, G., Hegedüs, R., Gerics, B., Farkas, R. *et al.* (2010). An unexpected advantage of whiteness in horses: the most horsefly-proof horse has a depolarizing white coat. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 277, 1643-1650.
- Horváth, G., Majer, J., Horváth, L., Szivák, I. & Kriska, G. (2008). Ventral polarization vision in tabanids: horseflies and deerflies (Diptera: Tabanidae) are attracted to horizontally polarized light. *Naturwissenschaften*, 95, 1093-1100.
- Hribar, L.J., Leprince, D.J. & Foil, L.D. (1991). Design for a canopy trap for collecting horse flies (Diptera, Tabanidae). *Journal of the American Mosquito Control Association*, 7, 657-659.
- Hribar, L.J., Leprince, D.J. & Foil, L.D. (1992). Feeding sites of some Louisiana Tabanidae (Diptera) on fenvalerate-treated and control cattle. *Journal of Economic Entomology*, 85, 2279-2285.
- Hughes, R.D., Duncan, P. & Dawson, J. (1981). Interactions between Camargue Horses and Horseflies (Diptera: Tabanidae). *Bulletin of Entomological Research*, 71, 227-242.
- Ivanov, V.P. (2007). [Investigation of the sensory organs of the horseflies *Hybomitra bimaculata* and *Tabanus bovinus* (Diptera: Tabanidae) by scanning electron microscope]. *Parazitologiya*, 41, 372-380.
- Jackson, J.O. & Wilson, B.H. (1965). Observations on some predators of horse fly and deer fly (Diptera: Tabanidae) eggs in Louisiana. *Annals of the Entomological Society of America*, 58, 934-935.
- Jacquiet, P., Lienard, E. & Franc, M. (2010). Bovine besnoitiosis: Epidemiological and clinical aspects. *Veterinary Parasitology*, 174, 30-36.

- Jeanbourquin, P. (2005). The role of odour perception in the sensory ecology of the stable fly, *Stomoxys calcitrans* L. University of Neuchâtel Neuchâtel, Swiss, p. 107.
- Jeanbourquin, P. & Guerin, P.M. (2007). Sensory and behavioural responses of the stable fly *Stomoxys calcitrans* to rumen volatiles. *Medical and Veterinary Entomology*, 21, 217-224.
- Jefferis, G. (2005). Insect olfaction: A map of smell in the brain. *Current Biology*, 15, R668-R670.
- Johnson, A.W. & Hays, K.L. (1973). Some predators of immature Tabanidae (Diptera) in Alabama. *Environmental Entomology*, 2, 1116-1117.
- Kennedy, J.S. (1983). Zigzagging and casting as programmed response to wind-borne odor: a review. *Physiological Entomology*, 8, 109-120.
- Kent, R.J. (2009). Molecular methods for arthropod bloodmeal identification and applications to ecological and vector-borne disease studies. *Molecular Ecology Resources*, 9, 4-18.
- Kiliç, A.Y. (1993). A study on the seasonal activities of *Tabanus bromius* L., *T. exclusus* Pand., *T. glaucopis* Meig., *T. spodopterus ponticus* Ols., Mch., Chv., *Philipomyia aprica* (Meig). (Diptera: Tabanidae) in Eskisehir Region. *Doga-Turkish Journal of Zoology*, 17, 303-310.
- Kingston, S.R., Wangberg, J.K. & Sanders, D.P. (1986). Flight behavior and nocturnal resting sites of *Tabanus abactor* Philip (Diptera, Tabanidae) in the Texas rolling plains. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 59, 337-342.
- Kline, D.L., Wood, J.R. & Cornell, J.A. (1991). Interactive effects of 1-octen-3-ol and carbon dioxide on mosquito (Diptera, Culicidae) surveillance and control. *Journal of Medical Entomology*, 28, 254-258.
- Konstantinov, S.A. (1993). The attack distance and the range and nature of the daily flight dispersion of horseflies in the genus *Hybomitra* (Diptera: Tabanidae). *Parazitologija*, 27, 419-426.
- Krinsky, W.L. (1976). Animal-disease agents transmitted by horse flies and deer flies (Diptera, Tabanidae). *Journal of Medical Entomology*, 13, 225-275.
- Krčmar, S. (2004). Ecological notes on *Tabanus bromius* L., and *Haematopota pluvialis* (L.), (Diptera : Tabanidae) of some flood areas in Croatian sections of the river Danube. *Journal of Vector Ecology*, 29, 376-378.
- Krčmar, S. (2005a). Response of horse flies (Diptera, Tabanidae) to different olfactory attractants. *Biologia*, 60, 611-613.
- Krčmar, S. (2005b). Seasonal abundance of horse flies (Diptera : Tabanidae) from two locations in eastern Croatia. *Journal of Vector Ecology*, 30, 316-321.
- Krčmar, S. (2007). Responses of Tabanidae (Diptera) to canopy traps baited with 4-methylphenol, 3-isopropylphenol, and naphthalene. *Journal of Vector Ecology*, 32, 188-192.
- Krčmar, S., Hribar, L.J. & Kopi, M.A. (2005). Response of Tabanidae (Diptera) to natural and synthetic olfactory attractants. *Journal of Vector Ecology*, 30, 133-136.
- Krčmar, S. & Lajos, P. (2011). Response of Horse Flies to Aged Equine urine (Diptera: Tabanidae). *Entomologia Generalis*, 33, 245-250.
- Krčmar, S. & Marić, S. (2006). Analysis of the feeding sites for some horse flies (Diptera, Tabanidae) on a human in Croatia. *Collegium Antropologicum*, 30, 901-904.
- Krčmar, S., Mikuska, A. & Merdić, E. (2006). Response of Tabanidae (Diptera) to different natural attractants. *Journal of Vector Ecology*, 31, 262-265.

- Krčmar, S., Mikuska, A. & Radolic, V. (2010). Comparison of sampling tabanids (Diptera: Tabanidae) by four different potential attractants. *Journal of Applied Entomology*, 134, 608-613.
- Kuiters, A.T., Bruinderink, G. & Lammertsma, D.R. (2005). Facilitative and competitive interactions between sympatric cattle, red deer and wild boar in Dutch woodland pastures. *Acta Theriologica*, 50, 241-252.
- Körner, C. (2007). The use of 'altitude' in ecological research. *Trends in Ecology & Evolution*, 22, 569-574.
- Laffont, C.M., Alvinerie, M., Bousquet-Melou, A. & Toutain, P.L. (2001). Licking behaviour and environmental contamination arising from pour-on ivermectin for cattle. *International Journal for Parasitology*, 31, 1687-1692.
- Laing, D.G. & Francis, G.W. (1989). The capacity of humans to identify odors in mixtures. *Physiology & Behavior*, 46, 809-814.
- Laveissiere, C. & Grebaut, P. (1990). Research on tsetse-fly traps (Diptera, Glossinidae) - Development of an economic model, the Vavoua trap. *Tropical Medicine and Parasitology*, 41, 185-192.
- Leak, S.G.A., Mulatu, W., Rowlands, G.J. & Dieteren, G.D.M. (1995). A trial of a cypermethrin pour-on insecticide to control *Glossina pallidipes*, *G. fuscipes fuscipes* and *G. morsitans submorsitans* (Diptera, Glossinidae) in south-west Ethiopia. *Bulletin of Entomological Research*, 85, 241-251.
- Leclercq, J. (2009). Marcel Leclercq (1924-2008), médecin, diptériste, parasitologue et pionnier de l'entomologie forensique. *Faunistic Entomology*, 61, 129-150.
- Leclercq, M. (1971a). Tabanidae (Diptera) des Basses-Alpes. *Bulletin des Recherches agronomiques de Gembloux*, 6, 424-431.
- Leclercq, M. (1971b). Tabanidae (Diptera) des Pyrénées (Huesca, Lerida, Andorra). *Pireneos, Jaca*, 102, 27-33.
- Leclercq, M. (1977). Répartition en altitude des Tabanidae (Diptera) dans la province de Huesca (Pyrénées centrales espagnoles). *Publicaciones del Centro pirenaico de Biología experimental*, 8, 67-98.
- Lefebvre, T. & Moncorps, S. (2010). *Les espaces protégés français : une pluralité d'outils au service de la conservation de la biodiversité*. Comité français de l'UICN, Paris, France.
- Legoff, F., Humpherysmith, I., Leclercq, M. & Chastel, C. (1991). Spiroplasmas from european Tabanidae. *Medical and Veterinary Entomology*, 5, 143-144.
- Lehane, M.J. (2005). *The biology of blood-sucking in insects*. 2nd edition. Cambridge University Press, Cambridge. p. 321.
- Leprince, D.J., Foil, L.D. & Byford, R.L. (1991). Evaluation of pyrethroid ear tag and spray treatment of cattle against horse flies (Diptera, Tabanidae). *Journal of Entomological Science*, 26, 271-280.
- Leprince, D.J., Hribar, L.J. & Foil, L.D. (1994). Responses of horse flies (Diptera, Tabanidae) to Jersey Bullocks and canopy traps baited with ammonia, octenol and carbon dioxide. *Journal of Medical Entomology*, 31, 729-731.
- Leprince, D.J. & Jolicoeur, P. (1986). Response to carbon dioxide of *Tabanus quinquevittatus* Wiedemann females (Diptera, Tabanidae) in relation to relative abundance, parity, follicle development, and sperm and fructose presence. *Canadian Entomologist*, 118, 1273-1277.

- Leprince, D.J., Lewis, D.J. & Parent, J. (1983). Biology of male tabanids (Diptera) aggregated on a mountain summit in southwestern Quebec. *Journal of Medical Entomology*, 20, 608-613.
- Lienard, E., Salem, A., Jacquiet, P., Grisez, C., Prevot, F., Blanchard, B. *et al.* (2013). Development of a protocol testing the ability of *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) to transmit *Besnoitia besnoiti* (Henry, 1913) (Apicomplexa: Sarcocystidae). *Parasitology Research*, 112, 479-486.
- Logan, J.G. & Birkett, M.A. (2007). Semiochemicals for biting fly control: their identification and exploitation. *Pest Management Science*, 63, 647-657.
- Mack, G., Walter, T. & Flury, C. (2013). Seasonal alpine grazing trends in Switzerland: Economic importance and impact on biotic communities. *Environmental Science & Policy*, 32, 48-57.
- Madubunyi, L.C., Hassanali, A., Ouma, W., Nyarango, D. & Kabii, J. (1996). Chemoecological role of mammalian urine in host location by tsetse, *Glossina* spp. (Diptera: Glossinidae). *Journal of Chemical Ecology*, 22, 1187-1199.
- Magnarelli, L.A. (1985). Blood feeding and oviposition by tabanids (Diptera) in the laboratory. *Journal of Medical Entomology*, 22, 600-603.
- Magnarelli, L.A. & Anderson, J.F. (1980). Feeding-behavior of Tabanidae (Diptera) on cattle and serological analysis of partial blood meals. *Environmental Entomology*, 9, 664-667.
- Maia, M., Clausen, P.-H., Mehlitz, D., Garms, R. & Bauer, B. (2010). Protection of confined cattle against biting and nuisance flies (Muscidae: Diptera) with insecticide-treated nets in the Ghanaian forest zone at Kumasi. *Parasitology Research*, 106, 1307-1313.
- Marchand, W. (1917). An improved method of rearing tabanid larvae. *Journal of Economic Entomology*, 10, 469-472.
- Maresca, C., Scoccia, E., Faccenda, L., Zema, J. & Costarelli, S. (2012). Equine Infectious Anemia: Active Surveillance in Central Italy 2007-2009. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32, 596-598.
- Martin, C., Pastoret, P.-P., Brochier, B., Humblet, M.-F. & Saegerman, C. (2011). A survey of the transmission of infectious diseases/infections between wild and domestic ungulates in Europe. *Veterinary Research*, 42. <http://www.veterinaryresearch.org/content/42/1/70>.
- McCoy, E.D. (1990). The distribution of insects along elevational gradients. *Oikos*, 58, 313-322.
- McElligott, P.E. & McIver, S.B. (1987). Range of attractiveness of carbon-dioxide to *Hybomitra* spp. (Diptera, Tabanidae). *Journal of the American Mosquito Control Association*, 3, 655-656.
- McElligott, P.E.K. & Galloway, T.D. (1991). Daily activity patterns of horse flies (Diptera, Tabanidae, *Hybomitra* spp.) in northern and southern Manitoba. *Canadian Entomologist*, 123, 371-378.
- Mehlhorn, H., Al-Rasheid, K.A.S., Abdel-Ghaffar, F., Klimpel, S. & Pohle, H. (2010). Life cycle and attacks of ectoparasites on ruminants during the year in Central Europe: recommendations for treatment with insecticides (e.g., Butox). *Parasitology Research*, 107, 425-431.
- MFKK Invention and Research Center Services (2011). Tabanoid Home page [en ligne] <http://www.tabanoid.eu>
- Mihok, S. (2013). Biting flies - The Nzi trap [en ligne] <http://www.nzitrap.com>
- Mihok, S. (2002). The development of a multipurpose trap (the Nzi) for tsetse and other biting flies. *Bulletin of Entomological Research*, 92, 385-403.

- Mihok, S., Carlson, D.A., Krafur, E.S. & Foil, L.D. (2006). Performance of the Nzi and other traps for biting flies in North America. *Bulletin of Entomological Research*, 96, 387-397.
- Mihok, S., Carlson, D.A. & Ndegwa, P.N. (2007). Tsetse and other biting fly responses to Nzi traps baited with octenol, phenols and acetone. *Medical and Veterinary Entomology*, 21, 70-84.
- Mihok, S., Kangethe, E.K. & Kamau, G.K. (1995). Trials of traps and attractants for *Stomoxys* spp. (Diptera, Muscidae). *Journal of Medical Entomology*, 32, 283-289.
- Mihok, S. & Lange, K. (2012). Synergism between ammonia and phenols for *Hybomitra* tabanids in northern and temperate Canada. *Medical and Veterinary Entomology*, 26, 282-290.
- Mihok, S. & Mulye, H. (2010). Responses of tabanids to Nzi traps baited with octenol, cow urine and phenols in Canada. *Medical and Veterinary Entomology*, 24, 266-272.
- Millenium Ecosystem Assessment (2005). *Ecosystems and Human Well-being: Biodiversity Synthesis*. World Resources Institute, Washington, DC. p. 100.
- Minár, J., Kostenko, L.A. & Riha, J. (1987). Losses in the milk yields of cows caused by the bloodsucking dipterous insects and the protection of cattles with oxamate repellent in the leningrad region. *Veterinarni Medicina*, 32, 355-363.
- Mohamed-Ahmed, M.M., Abdulla, M.A., Mohamed, Y.O., El Rayah, I.E. & El Amin, Y.E. (2007). Trapability of periurban populations of horseflies (Diptera: Tabanidae) in Karthoum State, Sudan. *Journal of Science and Technology*, 8, 46-63.
- Mohamed-Ahmed, M.M. & Mihok, S. (2009). Alighting of Tabanidae and muscids on natural and simulated hosts in the Sudan. *Bulletin of Entomological Research*, 99, 561-571.
- Mooring, M.S., Blumstein, D.T., Reisig, D.D., Osborne, E.R. & Niemeyer, J.M. (2007). Insect-repelling behaviour in bovids: role of mass, tail length, and group size. *Biological Journal of the Linnean Society*, 91, 383-392.
- Morgan, N.O. & Lee, R.P. (1977). Vegetative barriers influence flight direction of saltmarsh greenheads. *Mosquito News*, 37, 263-267.
- Mullen, G.R. & Durden, L.A. (2002). *Medical and veterinary entomology*. Academic Press, Amsterdam ; Boston. p. 597.
- Mullens, B.A. & Gerhardt, R.R. (1979). Feeding-behavior of some Tennessee Tabanidae. *Environmental Entomology*, 8, 1047-1051.
- Mullens, B.A. & Gerhardt, R.R. (1980). Faunal composition and seasonal distribution of tabanids in three geographic regions of eastern Tennessee (Diptera, Tabanidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 82, 48-58.
- Mullens, B.A., Lii, K.S., Mao, Y., Meyer, J.A., Peterson, N.G. & Szijj, C.E. (2006). Behavioural responses of dairy cattle to the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, in an open field environment. *Medical and Veterinary Entomology*, 20, 122-137.
- Muzari, M.O., Burgess, G.W., Skerratt, L.F., Jones, R.E. & Duran, T.L. (2010a). Host preferences of tabanid flies based on identification of blood meals by ELISA. *Veterinary Parasitology*, 174, 191-198.
- Muzari, M.O., Jones, R.E., Skerratt, L.F. & Duran, T.L. (2010b). Feeding success and trapability of horse flies evaluated with electrocuting nets and odour-baited traps. *Veterinary Parasitology*, 171, 321-326.
- Muzari, M.O., Skerratt, L.F., Jones, R.E. & Duran, T.L. (2010c). Alighting and feeding behaviour of tabanid flies on horses, kangaroos and pigs. *Veterinary Parasitology*, 170, 104-111.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B. & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853-858.

- Müller, G.C., Hogsette, J.A., Revay, E.E., Kravchenko, V.D., Leshvanov, A. & Schlein, Y. (2011). New records for the horse fly fauna (Diptera: Tabanidae) of Jordan with remarks on ecology and zoogeography. *Journal of Vector Ecology*, 36, 447-450.
- Nachtigall, W. (2004). Aspects of flight of the fast flying cattle fly, *Tabanus bovinus* (Diptera: Tabanidae). *Entomologia Generalis*, 27, 35-53.
- Nilssen, A. (1998). Effect of 1-octen-3-ol in field trapping *Aedes* spp. (Dipt., Culicidae) and *Hybomitra* spp. (Dipt., Tabanidae) in subarctic Norway. *Journal of Applied Entomology-Zeitschrift Für Angewandte Entomologie*, 122, 465-468.
- Okech, M. & Hassanali, A. (1990). The origin of phenolic tsetse attractants from host urine - studies on the pro-attractants and microbes involved. *Insect Science and Its Application*, 11, 363-368.
- Okiwelu, S.N. (1977). Observations on resting sites of Tabanidae in a Miombo woodland in Republic of Zambia. *Journal of Medical Entomology*, 14, 195-197.
- Oliveira, A.F., Ferreira, R.L.M. & Rafael, J.A. (2007). Seasonality and diurnal activity of Tabanidae (Diptera : Insecta) of canopy in the adolpho ducke forested reserve, Manaus, Amazonas State, Brazil. *Neotropical Entomology*, 36, 790-797.
- ONCFS (2012). Le cerf élaphe en France, situation 2010. In: *Lettre d'information n°16* [en ligne] <http://www.oncfs.gouv.fr/Espace-Presses-Actualites-ru16/La-situation-du-cerf-elaphe-en-France-en-2010-ar1303>
- Owaga, M.L.A., Hassanali, A. & McDowell, P.G. (1988). The role of 4-cresol and 3-normal-propylphenol in the attraction of tsetse flies to buffalo urine. *Insect Science and Its Application*, 9, 95-100.
- Palmer, J.S. (1969). Toxicologic effects of aerosols of N,N-Diethyl-m-Toluamide (DEET) applied on skin of horses. *American Journal of Veterinary Research*, 30, 1929-1932.
- Parashar, B.D., Chauhan, R.S., Prakash, S. & Rao, K.M. (1994). Mechanotactile and olfactory antennal sensilla in four species of female tabanids (Diptera). *Bollettino Di Zoologia*, 61, 121-128.
- Parashar, B.D., Gupta, G.P. & Rao, K.M. (1989). Control of hematophagous flies on equines with permethrin-impregnated eartags. *Medical and Veterinary Entomology*, 3, 137-140.
- Pavlova, R.P. (1985). The efficacy of the use of traps over many years for control of horse-flies (Diptera, Tabanidae) in pastures. *Meditinskaya Parazitologiya I Parazitarnye Bolezni*, 3, 41-44.
- Paynter, Q. & Brady, J. (1996). The effect of wind speed on the flight responses of tsetse flies to CO₂: A wind-tunnel study. *Physiological Entomology*, 21, 309-312.
- Peter, R.J., Van den Bossche, P., Penzhorn, B.L. & Sharp, B. (2005). Tick, fly, and mosquito control - Lessons from the past, solutions for the future. *Veterinary Parasitology*, 132, 205-215.
- Phelps, R.J. & Holloway, M.T.P. (1990). Alighting sites of female Tabanidae (Diptera) at Rekomitjie, Zimbabwe. *Medical and Veterinary Entomology*, 4, 349-356.
- Phelps, R.J. & Holloway, M.T.P. (1992). Catches of tabanidae in response to visual and odour attractants in Zimbabwe. *Journal of African Zoology*, 106, 371-380.
- Phelps, R.J. & Vale, G.A. (1976). Studies on the local distribution and on the methods of host location of some Rhodesian Tabanidae (Diptera). *Journal of the Entomological Society of South Africa*, 39, 67-81.
- Pitzer, J.B., Kaufman, P.E. & Tenbroeck, S.H. (2010). Assessing Permethrin Resistance in the Stable Fly (Diptera: Muscidae) in Florida by Using Laboratory Selections and Field Evaluations. *Journal of Economic Entomology*, 103, 2258-2263.

- Poiner, G.O. (1985). Nematode parasites and infectious diseases of Tabanidae (Diptera). *Myia*, 3, 599-616.
- Potts, S.G., Petanidou, T., Roberts, S., O'Toole, C., Hulbert, A. & Willmer, P. (2006). Plant-pollinator biodiversity and pollination services in a complex Mediterranean landscape. *Biological Conservation*, 129, 519-529.
- Powell, D.M., Danze, D.E. & Gwinn, M.A. (2006). Predictors of biting fly harassment and its impact on habitat use by feral horses (*Equus caballus*) on a barrier island. *Journal of Ethology*, 24, 147-153.
- Presley, S.M. & Russel, E.W. (1986). Field test of pyrethroid ear tags, sprays, and a pour-on formulation for control of horse flies on cattle. *Journal of Agricultural Entomology*, 3, 369-373.
- Rageau, J. & Mouchet, J. (1967). Les arthropodes hématophages de Camargue. *Cahier de l'ORSTOM, série Entomologie médicale*, V, 263-281.
- Ralley, W.E., Galloway, T.D. & Crow, G.H. (1993). Individual and group-behavior of pastured cattle in response to attack by biting flies. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie*, 71, 725-734.
- Ramdaya, P. & Benton, R. (2010). Evolving olfactory systems on the fly. *Trends in Genetics*, 26, 307-316.
- Rao, K.M. (1987). Repellency of *n,n*-diethylphenyl acetamine and dimethyl phthalate against muscids and tabanidae attacking cattle and equines. *Indian Veterinary Journal*, 64, 742-746.
- Raymond, H.L. (1987). Intérêt des pièges de Malaise appâtés au gaz carbonique pour l'étude des taons crépusculaires (Diptera: Tabanidae). *Insect Science and Its Application*, 8, 337-341.
- Raymond, H.L. (1989). Biologie des mouches-lezards, guêpes Bembicines de Guyane Française. *Bulletin de la Société Entomologique de France*, 93, 301-308.
- Raymond, H.L. & Rousseau, F. (1987). Abundance of horse flies (Diptera, Tabanidae) and reactions of cattle in a traditional farm of French-Guiana. *Acta Oecologica-Oecologia Applicata*, 8, 125-134.
- Roberts, L.W. & Wilson, B.H. (1967). Predation on horse flies by two bembicine wasp species in certain areas of southern Louisiana. *Journal of Economic Entomology*, 60, 412-415.
- Roberts, R.H. (1966). A technique for rearing the immature stages of Tabanidae (Diptera). *Entomological News*, 77, 79-82.
- Roberts, R.H. (1972). Relative attractiveness of CO₂ and a steer to Tabanidae, Culicidae and *Stomoxys calcitrans* (L). *Mosquito News*, 32, 208-211.
- Roelofs, W.L. (1984). Electroantennogram Assays: Rapid and Convenient Screening Procedures for Pheromone. In: *Techniques in Pheromone Research* (eds. Hummel, H.E. & Miller, T.A). Springer Series in Experimental Entomology New-York, pp. 131-159.
- Rutberg, A.T. (1987). Horse flies harassment and the social-behavior of feral ponies. *Ethology*, 75, 145-154.
- Ruther, J., Meiners, T. & Steidle, J.L.M. (2002). Rich in phenomena-lacking in terms. A classification of kairomones. *Chemoecology*, 12, 161-167.
- Saini, R.K. & Hassanali, A. (2007). A 4-alkyl-substituted analogue of guaiacol shows greater repellency to Savannah tsetse (*Glossina* spp.). *Journal of Chemical Ecology*, 33, 985-995.
- Salazar, F.V., Achee, N.L., Grieco, J.P., Prabaripai, A., Ojo, T.A., Eisen, L. *et al.* (2013). Effect of *Aedes aegypti* exposure to spatial repellent chemicals on BG-Sentinel (TM) trap catches. *Parasites & Vectors*, 6. <http://dx.doi.org/10.1186%2F1756-3305-6-145>

- Salem, A., Bouhsira, E., Lienard, E., Melou, A.B., Jacquiet, P. & Franc, M. (2012). Susceptibility of Two European strains of *Stomoxys calcitrans* (L.) to Cypermethrin, Deltamethrin, Fenvalerate, lambda-cyhalothrin, Permethrin and Phoxim. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 10, 249-257.
- Schneider, D. (1957). Elektrophysiologische untersuchungen von chemorezeptoren und mechanorezeptoren der antenne des seidenspinners *Bombyx mori* L. *Zeitschrift Für Vergleichende Physiologie*, 40, 8-41.
- Schneider, D. (1969). Insect olfaction: Deciphering system for chemical messages. *Science*, 163, 1031-1037.
- Schofield, S. & Brady, J. (1997). Effects of carbon dioxide, acetone and 1-octen-3-ol on the flight responses of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, in a wind tunnel. *Physiological Entomology*, 22, 380-386.
- Schofield, S., Cork, A. & Brady, J. (1995). Electroantennogram responses of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, to components of host odor. *Physiological Entomology*, 20, 273-280.
- Schofield, S. & Torr, S.J. (2002). A comparison of the feeding behaviour of tsetse and stable flies. *Medical and Veterinary Entomology*, 16, 177-185.
- Sheppard, C. & Wilson, B.H. (1976). Flight range of Tabanidae in a Louisiana bottomland hardwood forest. *Environmental Entomology*, 5, 752-754.
- Sheppard, C. & Wilson, B.H. (1977). Relationship of horse fly host seeking activity to edge of wooded areas in southern Louisiana. *Environmental Entomology*, 6, 781-782.
- Sofield, R.K. & Hansens, E.J. (1984). Rearing of *Tabanus nigrovittatus* (Diptera, Tabanidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 86, 195-198.
- Stella Nerio, L., Olivero-Verbel, J. & Stashenko, E. (2010). Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology*, 101, 372-378.
- Stendel, W., Hamel, H.D., Sieveking, H.U. & Bruhne, D. (1992). Analytical determination of the distribution of flumethrin on the body-surface of cattle following topical pour-on application. *Veterinary Parasitology*, 42, 137-143.
- Stoffolano, J.G., Angioy, A.M., Crnjar, R., Liscia, A. & Pietra, P. (1990). Electrophysiological recordings from the taste chemosensilla of *Tabanus nigrovittatus* (Diptera, Tabanidae) and determination of behavioral tarsal acceptance thresholds. *Journal of Medical Entomology*, 27, 14-23.
- Sünder, U., Moors, E., Hagemann, K. & Gauly, M. (2011). Comparative behaviour studies in horses infested with flying insects treated with insecticide or repellent substances. *Berliner Und Munchener Tierärztliche Wochenschrift*, 124, 28-35.
- Takken, W. & Knols, B.G.J. (2010). *Olfaction in vector-host interactions*. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands. p. 438.
- Tarry, D.W., Bernal, L. & Edwards, S. (1991). Transmission of bovine virus diarrhea by blood feeding flies. *Veterinary Record*, 128, 82-84.
- Tasin, M., Backman, A.C., Bengtsson, M., Ioriatti, C. & Witzgall, P. (2006). Essential host plant cues in the grapevine moth. *Naturwissenschaften*, 93, 141-144.
- ter Braak, J.F. & Smilauer, P. (2002). *Canoco reference manual and CanoDraw for Windows user's guide: software for canonical community ordination (version 4.5)*. Microcomputer power, Ithaca, NY, USA. p. 500.
- Teskey, H.J. (1969). *Larvae and pupae of some eastern north american Tabanidae (Diptera)*. Memoirs of the Entomological Society of Canada, Ottawa.
- Thompson, P.H. (1969). Collecting methods for Tabanidae (Diptera). *Annals of the Entomological Society of America*, 62, 50-57.

- Thompson, P.H. & Krauter, P.C. (1978). Rearing of Texas Tabanidae (Diptera). I. Collection, feeding, and maintenance of coastal marsh species. *Proceedings of Entomological Society of Washington*, 80, 615-625.
- Torr, S.J., Hall, D.R., Phelps, R.J. & Vale, G.A. (1997). Methods for dispensing odour attractants for tsetse flies (Diptera:Glossinidae). *Bulletin of Entomological Research*, 87, 299-311.
- Torr, S.J., Hall, D.R. & Smith, J.L. (1995). Responses of tsetse-flies (Diptera, Glossinidae) to natural and synthetic ox odors. *Bulletin of Entomological Research*, 85, 157-166.
- Torr, S.J. & Mangwirot, T.N.C. (2000). Interactions between cattle and biting flies: effects on the feeding rate of tsetse. *Medical and Veterinary Entomology*, 14, 400-409.
- Torr, S.J., Mangwirot, T.N.C. & Hall, D.R. (1996). Responses of *Glossina pallidipes* (Diptera: Glossinidae) to synthetic repellents in the field. *Bulletin of Entomological Research*, 86, 609-616.
- Torr, S.J., Mangwirot, T.N.C. & Hall, D.R. (2006). The effects of host physiology on the attraction of tsetse (Diptera : Glossinidae) and *Stomoxys* (Diptera : Muscidae) to cattle. *Bulletin of Entomological Research*, 96, 71-84.
- Torr, S.J. & Solano, P. (2010). Olfaction in *Glossina* - host interactions: a tale of two tsetse. In: *Olfaction in vector-host interactions* (eds. Takken, W & Knols, BGJ). Wageningen Academic Publishers The Netherlands, p. 437.
- Torr, S.J., Wilson, P.J., Schofield, S., Mangwirot, T.N.C., Akber, S. & White, B.N. (2001). Application of DNA markers to identify the individual-specific hosts of tsetse feeding on cattle. *Medical and Veterinary Entomology*, 15, 78-86.
- Tucker, C.A. & Lancaster, J.L. (1990). Collection and maintenance procedure for tabanid oviposition: a three-year study. *The Southern Entomologist*, 15, 429-437.
- Vale, G.A. (1980). Field studies of the responses of tsetse flies (Glossinidae) and other diptera to carbon dioxide, acetone and other chemicals. *Bulletin of Entomological Research*, 70, 563-570.
- Vale, G.A., Mutika, G. & Lovemore, D.F. (1999). Insecticide-treated cattle for controlling tsetse flies (Diptera : Glossinidae): some questions answered, many posed. *Bulletin of Entomological Research*, 89, 569-578.
- Vale, G.A. & Phelps, R.J. (1974). Notes on the host-finding behaviour of Tabanidae (Diptera). *Arnoldia Rhodesia*, 6, 1-6.
- Van Hennekeler, K., Jones, R.E., Skerratt, L.F., Fitzpatrick, L.A., Reid, S.A. & Bellis, G.A. (2008). A comparison of trapping methods for Tabanidae (Diptera) in North Queensland, Australia. *Medical and Veterinary Entomology*, 22, 26-31.
- Van Hennekeler, K., Jones, R.E., Skerratt, L.F., Muzari, M.O. & Fitzpatrick, L.A. (2011). Meteorological effects on the daily activity patterns of tabanid biting flies in northern Queensland, Australia. *Medical and Veterinary Entomology*, 25, 17-24.
- Wall, W.J. & Doane Jr, O.W. (1980). Large scale use of box traps to study and control saltmarsh greenhead flies (Diptera: Tabanidae) on Cape Cod, Massachusetts. *Environmental Entomology*, 9, 371-375.
- Wardhaugh, K.G. (2005). Insecticidal activity of synthetic pyrethroids, organophosphates, insect growth regulators, and other livestock parasiticides: An Australian perspective. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 789-796.
- Williamson, S.M. & Wright G.A. (2013). Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees. *Journal of Experimental Biology*, 216, 1799-1807.

- Wilson, B.H. (1967). Feeding, mating and oviposition studies of the horse flies *Tabanus lineola* and *T. fuscicostatus* (Diptera: Tabanidae). *Annals of The Entomological Society of America*, 60, 1102-1106.
- Wilson, B.H. (1968). Reduction of Tabanid populations on cattle with sticky traps baited with dry ice. *Journal of Economic Entomology*, 61, 827-829.
- Wilson, B.H. & Richards, C.G. (1969). Tabanid hosts in estuarine and aluvial areas of Louisiana. *Annals of the Entomological Society of America*, 62, 1043-1046.
- Wilson, B.H., Tugwell, N.P. & Burns, E.C. (1966). Attraction of tabanids to traps baited with dry ice under field conditions in Louisiana. *Journal of Medical Entomology*, 3, 148-149.
- Woltz, J.M., Isaacs, R. & Landis, D.A. (2012). Landscape structure and habitat management differentially influence insect natural enemies in an agricultural landscape. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 152, 40-49.
- Zardi, D. & Whiteman, D. (2012). Diurnal mountain wind systems. In: *Mountain weather research and forecasting*. (eds. Chow, F.K., DeWekker, S.F.J. & Snyder B.). Springer Berlin, p. 750.
- Zhu, J.W.J., Dunlap, C.A., Behle, R.W., Berkebile, D.R. & Wienhold, B. (2010). Repellency of a Wax-Based Catnip-Oil Formulation against Stable Flies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 12320-12326.

Annexes

Annexe 1. Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera, Muscidae): a review

Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera, Muscidae): a review

Frédéric Baldacchino¹, Vithee Muenworn², Marc Desquesnes^{3,4}, Florian Desoli¹,
Theeraphap Charoenviriyaphap², and Gérard Duvallet^{1,2,*}

¹ Centre d'Écologie Fonctionnelle et Évolutive (UMR 5175), Université Montpellier 3, Route de Mende, 34199 Montpellier Cedex 5, France

² Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

³ Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), Avenue Agropolis, 34398 Montpellier Cedex 5, France

⁴ Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

Received 28 May 2013, Accepted 13 August 2013, Published online 29 August 2013

Abstract – *Stomoxys* flies are mechanical vectors of pathogens present in the blood and skin of their animal hosts, especially livestock, but occasionally humans. In livestock, their direct effects are disturbance, skin lesions, reduction of food intake, stress, blood loss, and a global immunosuppressive effect. They also induce the gathering of animals for mutual protection; meanwhile they favor development of pathogens in the hosts and their transmission. Their indirect effect is the mechanical transmission of pathogens. In case of interrupted feeding, *Stomoxys* can re-start their blood meal on another host. When injecting saliva prior to blood-sucking, they can inoculate some infected blood remaining on their mouthparts. Beside this immediate transmission, it was observed that *Stomoxys* may keep some blood in their crop, which offers a friendly environment for pathogens that could be regurgitated during the next blood meal; thus a delayed transmission by *Stomoxys* seems possible. Such a mechanism has a considerable epidemiological impact since it allows inter-herd transmission of pathogens. Equine infectious anemia, African swine fever, West Nile, and Rift Valley viruses are known to be transmitted by *Stomoxys*, while others are suspected. Rickettsia (*Anaplasma*, *Coxiella*), other bacteria and parasites (*Trypanosoma* spp., *Besnoitia* spp.) are also transmitted by *Stomoxys*. Finally, *Stomoxys* was also found to act as an intermediate host of the helminth *Habronema microstoma* and may be involved in the transmission of some *Onchocerca* and *Dirofilaria* species. Being cosmopolite, *Stomoxys calcitrans* might have a worldwide and greater impact than previously thought on animal and human pathogen transmission.

Key words: *Stomoxys* flies, Mechanical vectors, Pathogens, Vector-transmitted diseases.

Résumé – **Transmission de pathogènes par les Stomoxes (Diptera, Muscidae) : une synthèse.** Les stomoxes sont des vecteurs mécaniques de pathogènes présents dans le sang et les tissus cutanés de leurs hôtes, spécialement le bétail, mais aussi parfois les humains. Pour le bétail, leurs effets directs sont principalement la perturbation des animaux, les lésions de la peau, la réduction de l'alimentation, le stress, la spoliation sanguine et un effet immunosuppresseur global. Ils entraînent aussi le regroupement des animaux pour une protection mutuelle ; tout cela favorise le développement des parasites chez les hôtes et leur transmission. Leur effet indirect est la transmission mécanique de pathogènes. En cas de repas interrompu, les stomoxes peuvent reprendre leur repas de sang sur un autre hôte. En injectant de la salive avant l'absorption de sang, ils peuvent inoculer du sang infecté qui restait sur leurs pièces buccales. En plus de cette transmission immédiate, il a été observé que les stomoxes pouvaient conserver du sang dans leur jabot, qui offre un meilleur environnement pour les pathogènes. Ces derniers peuvent être régurgités lors du prochain repas de sang. Ainsi, une transmission retardée semble possible par les stomoxes. Un tel mécanisme a une conséquence épidémiologique considérable, puisqu'il permet une transmission de pathogènes entre les troupeaux. Les virus de l'anémie infectieuse équine, de la fièvre porcine africaine, des fièvres à West Nile ou de la Vallée du Rift, sont connus pour être transmis par des stomoxes ; d'autres sont suspectés. Des rickettsies (*Anaplasma*, *Coxiella*), d'autres bactéries et des parasites (*Trypanosoma* spp., *Besnoitia* spp.) sont aussi transmis par les stomoxes. Enfin, les stomoxes sont aussi des hôtes intermédiaires de l'helminthe *Habronema microstoma* et pourraient être impliqués dans la transmission de certaines espèces d'*Onchocerca* et de *Dirofilaria*. En étant cosmopolite, *Stomoxys calcitrans* pourrait avoir un impact plus important qu'initialement imaginé sur la transmission de pathogènes aux animaux et aux humains.

*Corresponding author: gerard.duvallet@univ-montp3.fr; gduvallet@aol.com

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. Introduction

The genus *Stomoxys* (Diptera: Muscidae) contains 18 described species [136]. They are obligate blood-sucking insects and some species are considered significant economic pests of livestock and other warm-blooded animals in many parts of the world [136]. *Stomoxys calcitrans* is a cosmopolitan species. In addition to *S. calcitrans*, several other stomoxyine flies also readily attack domestic animals, including *S. niger*, *S. sitchensis*, and *S. indicus* [123]. Both male and female stable flies feed on blood and they are often aggressive and persistent feeders; they even can attack humans in the absence of preferred hosts. It has been recently shown that those flies (*S. calcitrans* and *S. niger*) also take sugars from flowers or ripe fruits [89]. Although they are most active and problematic around livestock farms, they can also be a nuisance insect on coastal beaches and in residential areas near agricultural production [91] (Figure 1).

Stable flies can cause severe problems in dairies and feedlots, where larval stages develop in moist soil and similar substrates [81, 88]. Severe biting activity can result in a reduction in animal weight and milk production. Reductions of 19% in weight gain and of 40–60% in milk yields have been reported [18, 19, 124]. *S. calcitrans* may also cause specific skin lesions like necrotic dermatitis at the tips of dog's ears, exsudative dermatitis on the legs of horses and in the "hair whirlpools" on the back of calves [131].

Stomoxys may also affect wild animals. A die-off of bongos (*Tragelaphus eurycerus* (Ogilby, 1837)) and other large ungulates occurred following a *Stomoxys* biting fly outbreak in the lowland forest of the northern Republic of Congo in April–May 1997 [37]. The direct effects of swarming biting flies and the resulting attempts to fight off the flies seem to have contributed to extreme fatigue, disruption of foraging patterns, modification of behavior, and increased exposure to predation and accidents. Observations of bongos and examination of carcasses suggested that the physical torment and disruption caused by the biting of *Stomoxys* contributed directly to the deterioration of their condition [37].

Independent from their direct nuisance (annoyance, toxic effects of saliva, blood loss, etc.), a high number of flies biting cattle and other affected animals may have a direct role in the epidemiology of transmissible diseases. Several *Stomoxys* species have been implicated as mechanical vectors of pathogens, including viruses, bacteria, protozoa, and helminths. This review discusses the direct and indirect effects of *Stomoxys* flies and provides an overview of existing literature on the pathogens they can transmit.

2. Direct nuisance and secondary effects

As partly described for tabanids [35] and stomoxes [11], the direct nuisance of *Stomoxys* flies and other biting flies can be summarized as follows:

2.1 Annoyances of animals

By flying around the eyes, landing on the skin, and attempting to bite, these insects disturb animals. This is especially



Figure 1. *Stomoxys calcitrans*.

important for livestock; they induce defensive movements of the head, ears, skin, legs, and tail, and escaping- or hiding-behaviors (hiding in a forest, or deep into the water; close gathering of animals to protect each other, etc.). Thus, their annoyance causes: (1) a loss of energy, (2) a reduction of the time spent feeding and the total feed intake, (3) stress due to flying and landing events.

2.2 Pain and toxicity of skin puncture and saliva injection

The physical action of mouth parts and the chemical action of the saliva create a local pain at the biting site, which is a source of stress for the animals. It is also the origin of local cutaneous infections or secondary infections in case of myiasis. Additionally, the chemical and immunogenic actions of the saliva have a general toxicity and create a general immune response which contributes to stress and immunosuppression.

2.3 Blood loss

As blood feeders, *Stomoxys* flies can consume an average of 11–15 μL of blood per meal [106]. In addition to the direct loss of blood from feeding, more blood may pour out from the biting site when the mouthparts are removed from the skin, which may dry on the skin or be promptly absorbed by sucking flies. Often, *Stomoxys* will be disturbed by high abundances of sucking flies, which interrupts their blood meal, and creates more opportunities to lose blood by pouring from the biting site.

The primary consequences of loss of energy, reduction of food intake, stress, and blood losses are a reduction of meat, milk, manure production, and draught power, which is summarized by a consequent loss of productivity with significant economic impact. For example, Barré [4] estimated in La Réunion that a total of 0.5–1 L of milk/cow/day is lost due to stomoxes in highly infested farms. In their study of grazing yearling steers/calves, Campbell *et al.* [18] observed an average loss of 0.2 kg in the weight gains of untreated animals versus insecticide-treated ones.

As a consequence, these direct effects not only influence the rate of livestock production, but they also favor disease transmission. Indeed, the secondary consequences of the direct nuisance are (i) close gathering of animals (as a behavior to protect each other) which increases the probability for biting flies to move from one to another animal in case of interrupted feeding; (ii) immunosuppressive effects on the hosts (as a consequence of stress, energy losses, decrease in food-intake, and the toxic activity of the fly saliva [115]) have two important consequences: enhancing the pathogenesis of the infected animals (thus increasing the contaminative boost transmitted by the insects), and reducing the resistance of potential hosts (thus making the host more receptive and pathogen development easier). In summary, the direct effects of biting insects are notably favoring pathogen transmission and enhancing their development [33].

3. Mechanism of pathogens transmission by *Stomoxys* flies

Mechanical transmission is a simple mechanism of pathogen transmission which, in itself, is considered to be the most important “indirect effect” of blood-sucking insects. This mode of transmission appears to occur through either contamination of mouthparts or regurgitation of digestive tract contents. The chain of events leading to mechanical transmission is as follows: the initial blood feeding upon an infected animal is often interrupted because of the pain of the bite, leading to defensive movements of the host; the fly may then fly off and land on another animal, thus it is able to transfer blood pathogens remaining in its mouthparts to a susceptible animal. Pathogens are then transferred during the initiation of the second feeding through the saliva that hematophagous insects inject prior to blood-sucking. In addition to this “mouthpart” contamination, experimental evidence has shown that stable flies can regurgitate part of a previous blood meal before taking up another one [13]. Indeed, the regurgitation of a relatively high amount of the previously ingested blood meal could be an important way of transmitting high doses of disease agents. However, this phenomenon is limited by the short survival of pathogens which may be inhibited by digestive secretion. For example, *T. vivax* survival in a tabanid’s guts was estimated to be around 5–7 h [38]. However, as observed by some authors in experimental conditions [23], some blood ingested can be directed to the insect’s crop, where pathogens may survive longer since it is a more friendly environment devoid of digestive secretions. Blood can stay 24 h or more in the crop before being directed either to the gut or partially regurgitated during the early stage of a new blood meal. In such conditions, a partial regurgitation of blood from the crop would allow a delayed transmission, possibly up to 24 h or more. In tabanids, the interval between blood meals is quite long (5–7 days), above the maximum survival of most of the pathogens [43], regardless of whether they are kept in the crop or the gut. However, in stomoxe flies, which are frequent feeders [103], the interval between blood meals is variable, from 4 to 72 h [43, 74]. Thus, the crop regurgitation of infectious blood could easily establish in these flies.

As it was experimentally studied and mathematically modeled for tabanids and trypanosomes [35], the potential ability for transmission of pathogens mainly depends on the volume of blood left on the mouthparts after feeding (which is essentially governed by the size of the insect’s mouth parts), the density of biting-insects flying around the animals, the level of parasitaemia in the host blood, and the relative proportion of infected and non-infected hosts which are close together. Specifically, it may also vary with the minimum infectious dose of a pathogen, the duration of the survival period of the pathogen in the insect, and the duration of the periods between repeated blood-sucking [42, 105].

Pathogens possibly transmitted by tabanids have been reviewed by several authors and proved to be as varied as bacteria, viruses, and parasites [41, 73]. Pathogens transmitted by stomoxes are thought to be the same; however, some more specific links may exist between stomoxes, pathogens, and their hosts, due to peculiar host species trophic affinity, type of bite or behaviour of stomoxes, and possible delayed transmission due to their higher frequency of blood meals. On top of the pathogens that are mechanically transmitted, stomoxes may also be a biological vector of a limited number of other pathogens.

4. Viruses

Numerous viruses can be transmitted mechanically by *Stomoxys* spp.

4.1 Equine infectious anemia virus (EIAV)

Equine infectious anemia is considered a worldwide disease caused by a *Lentivirus* (Retroviridae). EIAV is responsible for a persistent infection in horses that is characterized by recurring cycles of viremia and clinical episodes of fever, anemia, edema, thrombocytopenia, and various wasting symptoms [76]. Blood from persistently infected horses is the most important source of EIAV for transmission.

The mechanical transmission of EIAV by arthropods is generally accepted as a major factor in the transmission of this virus [64]. Large hematophagous insects, especially tabanids, which feed from extravascular sites (i.e., pool feeding) appear to be the most efficient vectors [63]. But stable flies have also been reported to be capable of mechanically transmitting EIAV [44, 52, 56, 110].

4.2 African swine fever virus (ASFV)

African swine fever, a disease of pigs, is caused by a virus of the genus *Asfivirus* (Asfarviridae). ASFV was first described from East Africa in 1921 [86], but subsequently identified in southern, central, and western Africa [97, 98]. The most recent outbreak of ASF outside Africa started in 2007 in Georgia and has spread to neighboring countries. Fever, skin lesion, convulsions, and usually death within 15 days (young animals) are the main symptoms. These signs are often indistinguishable from those of Classical Swine Fever.

ASFV persists in nature in a sylvatic cycle of transmission between wild suids (mainly the warthog, *Phacochoerus aethiopicus*) and *Ornithodoros moubata* ticks, which infest their burrows [129]. The transmission can also occur by per-oral route, through the ingestion of infected feed [24]. *S. calcitrans* has also been shown to be an experimentally competent mechanical vector. ASFV was transmitted to susceptible pigs by *S. calcitrans* infected one hour and 24 h previously and the virus survived in those flies for at least two days without apparent loss of titer [80]. The persistence of high titers of virus in stable flies for periods of up to two days strongly suggests that transmission should be possible for at least this length of time.

4.3 West Nile fever virus (WNV)

West Nile Fever is caused by a *Flavivirus* (Flaviviridae). WNV is a zoonotic pathogen that is primarily transmitted between birds by mosquitoes, but is also transmitted to mammals, including horses and humans [71]. Several species of *Culex* mosquitoes are particularly efficient vectors. This virus is currently the most widely distributed arbovirus in the world, occurring on all continents except Antarctica [72].

Johnson *et al.* [66] reported that stable flies were contaminated by WNV through feeding upon American white pelicans. Fifty-four percent of abdomens from 67 blood-engorged flies tested positive for WNV. Pelican viremia levels from the blood-engorged fly abdomens revealed that at least one of the ill pelicans circulated a viremia capable of infecting *Culex* mosquito vectors. Stable flies may also be involved in WNV transmission within the pelican breeding colony by serving as either a mechanical vector or as a source for oral infection if ingested by predators [36].

4.4 Rift Valley fever virus (RVFV)

Rift Valley fever is a zoonotic disease of domestic ruminants and humans caused by an arbovirus belonging to the genus *Phlebovirus* (Bunyaviridae). It is widespread in Africa and has recently spread to Yemen and Saudi Arabia. RVF epidemics are becoming more and more frequent in Africa and the Middle East, probably in relation to climatic changes. Clinical manifestations vary depending on age and animal species. Animals usually experience fever with depression, hemorrhagic diarrhea, bloodstained muco-purulent nasal discharge, and icterus. Mortality rates may vary from 10% to 95% for newborn lambs. In pregnant animals, abortions are frequent, ranging from 5% to 100% [21].

Hoch *et al.* [59] conducted experimental studies to determine if hematophagous Diptera were capable of mechanical transmission of RVFV to laboratory animals. All species tested (*Glossina morsitans*, *Aedes aegypti*, *Aedes taeniorhynchus*, *Culex pipiens*, *Stomoxys calcitrans*, *Lutzomyia longipalpis*, and *Culicoides variipennis*) mechanically transmitted the virus to hamsters. *S. calcitrans* was able to mechanically transmit RVFV to susceptible hamsters (*Mesocricetus auratus*) after probing on infected hamsters with high viral titers. Therefore, *S. calcitrans* should be considered a possible mechanical vector of this virus and may contribute to the rapid spread of an RVF

outbreak because of its close association with domestic animals that serve as amplifying hosts of RVFV. Other *Stomoxys* species present in Africa and elsewhere may also play similar roles [121].

4.5 Lumpy skin disease virus (LSDV)

Lumpy skin disease, caused by a *Capripoxvirus* (Poxviridae), is characterized in cattle by pyrexia, generalized skin lesions (nodules), internal pox lesions, and lymphadenopathy [69]. Lumpy skin disease was first recognized in Zambia in 1929 and is now endemic in most of sub-Saharan Africa, parts of North Africa and has also been reported in the Middle East [27].

S. calcitrans has been shown to mechanically transmit capripox virus (Yemeni strain) to susceptible hosts (sheep, goat) under experimental conditions [68, 80]. Lumpy skin disease virus was detected by isolation from *S. calcitrans* immediately post-feeding, and viral nucleic acid was detectable by PCR up to 24 h post-feeding [22]. Although epidemiological observations also suggest the role of stomoxe flies in the transmission of the LSDV [132], a formal demonstration has not yet been made.

4.6 Bovine herpes virus (BHV)

Bovine herpes virus-2 (BHV-2) (genus *Herpesvirus*, Herpesviridae) infection causes a bovine vesicular and ulcerative skin disease known as bovine herpes mammillitis (BHM). This is a localized, painful condition of the teats and udders, usually seen in first calving heifers. Both BHM and pseudo-lumpy skin disease (another manifestation of BHV-2 infection) have a seasonal prevalence, and both are thought to be initiated by biting insects. BHM can only be produced experimentally when the virus is introduced below the level of the stratum germinativum of the udder or teat skin, and *S. calcitrans* has been proposed as a mechanical vector [47, 48]. *S. calcitrans* fed on infected blood mechanically transmitted enough of the virus to infect cell monolayers in an experimental infection [49], and therefore stable flies are considered a potential mechanical vector of BHV-2.

4.7 Bovine leukosis virus (BLV)

The ability of tabanids to transmit enzootic BLV (genus *Lentivirus*, Retroviridae) has been experimentally demonstrated [45]. However, the role of stable flies has been investigated but not yet been demonstrated [14, 46, 126].

4.8 Vesicular stomatitis virus (VSV)

The mechanical transmission of VSV (genus *Vesiculovirus*, Rhabdoviridae) has been experimentally shown with stable flies [39]; but since 1955, no further studies have confirmed this result [19]. However, a recent study demonstrated the mechanical transmission of VSV to domestic swine by black flies [113].

4.9 Blue tongue virus (BTV)

BTV (genus *Orbivirus*, Reoviridae) causes an infectious, non-contagious disease of ruminants, and is transmitted between its vertebrate hosts by *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) acting as a biological vector. Until 2006, BTV existed around the world in a broad band covering much of the Americas, Africa, southern Asia, northern Australia and, occasionally, the southern fringe of Europe. Recently the virus causing this disease has extended northwards into areas of Europe. A BTV epizootic in South-Western France in the summer and autumn of 2008, with a high incidence of new cases, raised the question about the possibility of BTV transmission not only by biological *Culicoides* vectors but also by mechanical vectors. These mechanical vectors would amplify the epizootics observed, with biological consequences.

Other viruses are also suspected to be transmitted by *Stomoxys* such as Classical Swine Fever, African Horse Sickness, Yellow Fever, Foot and Mouth Disease, Myxomatosis, Bovine Viral Diarrhea, and a number of viral Encephalites (West Equine Encephalitis, East Equine Encephalitis, Central Equine Encephalitis, Venezuelan Equine Encephalitis, etc.); however no demonstrations were made so far [73].

5. Bacteria (with the exception of Rickettsia)

5.1 Anthrax

Anthrax is caused by a spore-forming bacterium, *Bacillus anthracis*, and is considered a serious zoonotic disease. The disease affects animals and humans, inducing pulmonary, gastro-intestinal, or cutaneous symptoms, including a boil-like skin lesion that eventually forms a typical ulcer with a black center (eschar). It is often lethal in the absence of treatment. Although *B. anthracis* can be found worldwide, anthrax cases usually only occur in a limited geographic region. Outbreaks are most common in areas characterized by alkaline, calcareous soil, and in warm environments with periodic episodes of flooding [62]. Anthrax is particularly common in parts of Africa, Asia, and the Middle East. Herbivores usually become infected when they ingest sufficient numbers of spores in soil or on plants in pastures. Carnivores usually become infected after eating contaminated meat.

However, *B. anthracis* infections can also be mechanically transmitted by stable flies. Schuberg and Kuhn [108] demonstrated with mice and guinea pigs that infections could be transmitted from sick animals to healthy ones via *S. calcitrans*. Schuberg and Boing [107] were able to infect sheep and goats using *S. calcitrans* [62]. Stable flies transmitted anthrax, even when they were held at room temperature for 4 h after exposure to the bacteremic guinea pig before being allowed to continue feeding on the susceptible animals. The potential for flies to mechanically transmit anthrax suggests that fly control should be considered as part of a program for control of epizootic anthrax [120].

5.2 Other bacteria

Mechanical transmission by stomoxes has been demonstrated for *Pasteurella multocida* (Hemorrhagic Septicemia in

Buffalo), *Erysipelothrix rhusiopathiae* (an agent of erysipelas in animals and erysipeloid in humans), and *Francisella tularensis* (responsible for tularemia) [73]. For other bacteria, mechanical transmission by stomoxes is only suspected: *Clostridium perfringens*, *Pasteurella multocida*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella melitensis*, *Listeria monocytogenes*, *Leptospira* spp. [73].

Enterobacter sakazakii is an opportunistic food-borne pathogen causing meningitis, enterocolitis, and sepsis. Mramba *et al.* [87] reported that adult stable flies can carry *E. sakazakii* for several weeks and contaminate their food sources with this pathogen. *E. sakazakii* was supported during the development of immature stable flies in sterilized cattle manure and sterilized artificial medium. In addition, *E. sakazakii* survived during stable fly development and colonized the gut of emerging adult stable flies, which makes stomoxe flies biological vectors of this bacterium.

Dermatophilus congolensis is a Gram-positive coccobacillary actinomycete that causes an exsudative dermatitis in a variety of species, most notably in ruminants and horses, although rare infections occur in cats, dogs, and humans [1, 15]. It has a worldwide distribution but is more prevalent in the humid tropics and subtropics [133]. Domestic flies (*Musca domestica*), and biting insects such as *S. calcitrans*, *Glossina morsitans*, and mosquitoes have been reported to be involved in the transmission of the disease by breaking the skin barrier during feeding and releasing variable amounts of serum and blood which provide moisture, nutrition, and a suitable microclimate for the multiplication of *D. congolensis*. Richard and Pier [100] successfully infected rabbits through contaminated flies (*S. calcitrans* and *M. domestica*). Macadam [79] saw lesions of *D. congolensis* infection on sheep and horses in Sabah and noted that most lesions were not associated with ticks so he presumed that *S. calcitrans* was the main vector.

De Castro *et al.* [28] reported the existence of 33 distinct species of bacteria in stable flies. Bacterial species were isolated from three different segments (cuticle, mouthparts, and abdominal alimentary tract) of stable flies. A total of 161 colonies of 33 distinct species were isolated, such as *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *S. intermedius*. The cuticle was the segment from where most species were isolated, followed by the abdominal digestive tract and mouthparts.

6. Rickettsia

6.1 Bovine anaplasmosis

Bovine anaplasmosis caused by *Anaplasma marginale* occurs in tropical and subtropical areas throughout the world. The outstanding feature of clinical anaplasmosis is anemia associated with phagocytosis of parasitized erythrocytes.

A. marginale is poorly transmitted but surely amplified by ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Dermacentor andersoni*) and many hematophagous diptera are implicated as mechanical vectors, including *S. calcitrans*, *Haematobia irritans*, and *Tabanus* spp. [53, 70, 109, 122].

Anaplasma marginale multiplies in the lumen of the tick's gut (or Malpighi tubes) and migrates to the salivary glands of the ticks at adult stage. Thus *Anaplasma* can be re-injected into

the host by adult ticks [20]. When there is a massive infestation of ticks, a large boost in re-injected *Anaplasma* may lead to immune failure and can explain why clinical cases of anaplasmosis are frequently observed during times of high tick infestations. However, this does not explain the transmission of *Anaplasma* by ticks. Although intrastatal transmission is possible during the adult stage, it requires the transfer of ticks from one to another host, which is numerically negligible for female ticks and occurs at low rate for males of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Thus ticks must be considered amplifiers of the parasitic burden rather than vectors [29]. On the contrary, Tabanids and stomoxes are responsible for the mechanical transmission of *Anaplasma* through blood-contaminated mouthparts of biting flies. Scoles *et al.* [109] provided evidence that the Florida strain of *A. marginale*, which is not transmissible by ticks, was more efficiently retained in stable fly mouthparts than was the St Maries strain, which is tick transmissible. The mechanical transmission is likely the major route of *A. marginale* in certain areas of the USA, Central and South America, and Africa, when tick vectors are absent.

A survey by Oliveira *et al.* [94] indicated that the exposure of cattle to *A. marginale* is common in dairy herds of Costa Rica and demonstrated the association between seroprevalence and presence of tabanids and stable flies. This endemic instability situation is probably due to inadequate vector control.

6.2 Other rickettsia

Q fever is a disease caused by *Coxiella burnetii* in cattle, goats, sheep, dogs and humans [26]. It can be transmitted directly by inhalation of dust contaminated by dried placental material or excreta of infected animals. It can also be transmitted by ticks, which are considered long-term carriers [111]. Livestock is commonly infected and can act as a reservoir. Clinical signs are fever, anorexia, respiratory signs, and abortion.

Flies that feed on the feces, milk, carcasses, or blood of domestic animals can be infected with *Coxiella burnetii* [61]. *S. calcitrans* collected from an elk and cattle ranch were positive for *C. burnetii* DNA [90] and should therefore be suspected as a mechanical vector of this bacterium.

7. Protozoa

7.1 Animal trypanosomes

Animal trypanosomes are major pathogens of livestock in Africa, they are mainly transmitted by tsetse flies, and can induce anemia, loss of milk and meat production as well as abortion and death. However, not only tsetse flies can transmit trypanosomes. Mechanical transmission of several *Trypanosoma* species has been demonstrated, notably for *T. vivax*, *T. congolense*, *T. brucei*, and *T. evansi* [31–33, 83, 101]. The relative impact of mechanical transmission is variable from one species to another. In the case of *T. evansi*, which is responsible for a worldwide disease called surra, and for *T. vivax* in Latin America, mechanical transmission is nearly the only route of transmission, and is thus very crucial [30, 93]. In their early series of experiments, Bouet and Roubaud [10] demonstrated

that *T. evansi* might not only be immediately mechanically transmitted by stomoxes, but may also be transmitted with delays of 24, 48, and even 72 h. These experiments demonstrated a peculiar capacity of stomoxes for delayed transmission while compared to tabanids, such delayed transmission has never been observed.

The clinical signs of surra in most domesticated mammals and wild animals are characterized by fever and anemia, enlargement of the lymph nodes and spleen, followed by emaciation, edema, abortion, and cachexia [12]. Mihok *et al.* [83] demonstrated that *S. varipes* was capable of transmitting *T. evansi* mechanically to mice in the laboratory. Sumba *et al.* [114] studied the mechanical transmission of *T. evansi* (South American origin) and *T. congolense* of Kilifi DNA type (Kenyan origin) in laboratory mice using the African stable flies *S. niger niger* and *S. taeniatus*. *T. congolense*, one of the most important etiologic agents of African Animal Trypanosomosis, was also transmitted by *S. n. niger* at low rates and *T. evansi* was transmitted by both *Stomoxys* species at higher rates [114].

Two outbreaks of trypanosomosis caused by *T. evansi* in camels occurred in France in 2006 and in Spain in 2008. Both outbreaks were associated with the import of camels from the Canary Islands [55]. In France, trypanosomes were observed in the blood of five camels, three of them were indigenous to the farm and two had been imported. The parasite was probably transmitted by tabanids and *S. calcitrans*, which were abundant from July to September 2006. No parasites were observed in other animals on the farm or on neighboring farms, but some of the sheep on these farms were positive by PCR or serology [34].

Cuglovici *et al.* [25] assessed the epidemiological situation of bovine trypanosomosis caused by *T. vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. The highest incidence of the seroprevalence observed could be correlated with an increased population of *S. calcitrans* flies in that region.

7.2 *Besnoitia besnoiti*

Bovine besnoitiosis is a protozoal disease of cattle caused by the cyst-forming apicomplexan parasite *Besnoitia besnoiti*. This parasite has domestic and wild bovids as intermediate hosts. Bovine besnoitiosis is clinically characterized by the succession of three phases: (i) the initial febrile syndrome with photophobia, epiphora, ocular and nasal discharges, arrest of rumination, anorexia, increased heart and respiratory rates; (ii) the second phase with enlargement of lymph nodes, generalized edema, and hyperesthesia of the skin and; (iii) the third phase, i.e. the chronic form, with scleroderma, hyperkeratosis, hyperpigmentation, and extensive alopecia. Despite the recovery of appetite, weight loss becomes more marked, and death can occur in about 10% of cases [65, 77]. Bovine besnoitiosis had been previously described in Africa, the Middle East, and Europe, and was deemed to be an emergent disease in the 1990s in European countries such as Spain, Portugal, France, Italy, and Germany [104]. The life cycle of *B. besnoiti* remains a mystery: the definitive host is unknown and the transmission routes are poorly understood. *B. besnoiti* is thought to be transmitted mainly by hematophagous insects [65].

Mechanical transmission of *B. besnoiti* by *Stomoxys* has been demonstrated [8, 78] and the existence of blood-sucking flies could be a risk factor for the rapid spread of the disease.

A long-term investigation was performed in a dairy cattle farm localized in an enzootic area of besnoitiosis of South-western France between March 2008 and May 2009. The seroprevalence determined by Western blot in a cohort of 57 animals continuously present during the whole survey increased from 30% in March 2008 to 89.5% in May 2009. New positive *B. besnoitia* seroconversions occurred throughout the year with the highest number in spring. In addition, many seroconversions were reported in the two months before turn-out and could be associated with a high indoor activity of *S. calcitrans* during this period [77].

7.3 Other protozoa

Berberian [6] successfully transmitted *Leishmania tropica* by the bites of *Stomoxys calcitrans*. But to our knowledge, this experiment has never been repeated, and there is no epidemiological evidence that this occurs in the nature.

8. Helminths

8.1 *Habronema microstoma*

Habronemosis caused by the nematode *H. microstoma* is considered to have a global distribution. *Musca domestica* and *S. calcitrans* were found to act as intermediate hosts for *H. microstoma* [130]. The competence of *S. calcitrans* as a vector of *H. microstoma* was demonstrated by the discovery of nematode DNA in different anatomic parts (heads, thoraces, and abdomens) of both field-collected and laboratory-reared flies [119]. The adults of *H. microstoma* occur on the horse stomach mucosa under a layer of mucus and can cause inflammation of the mucosa, followed by digestive disturbances or even chronic gastritis and ulceration. Oviparous females of *Habronema* release embryonated eggs which pass into the feces. The embryonated eggs or the larvae that hatch in the fecal mass are ingested by maggots (*Musca* or *Stomoxys* larvae), within which they develop to the infective L3 stage. The infective stage is reached when the stable fly imago emerges from the puparium. The infective larvae are deposited on the nostrils, lips, eyes, or wounds of the host when the stable flies feed. Larvae deposited around nostrils and lips are swallowed and mature in the stomach of host. Gastric habronemosis is characterized by a chronic catarrhal gastritis with symptoms of varying degrees of severity, such as anorexia/dysorexia, digestive disorders, diarrhea, progressive weight loss, ulcers, and post-prandial colics [119]. Larvae deposited on mucous membranes (vulvae, prepuce, eye) or on injured tissues cannot complete their life cycle; however, they induce a local inflammatory reaction with strong eosinophilia causing cutaneous "summer sores" and/or ophthalmic habronemosis [118, 130].

8.2 Other helminths

Mechanical transmission by stable flies is also suspected for the nematodes *Dirofilaria repens* (which induces subcutaneous

nodules in cats and dogs) [73], *Dirofilaria roemeri* (which induces subcutaneous nodules in wallabies and kangaroos), and *Onchocerca gibsoni* (subcutaneous filaria).

Associated with the dispersion of stable flies, the dissemination of pathogenic agents carried on their cuticle can also be important. Stable flies can disseminate microorganisms to many places and materials, including food for animals. They have the ability to be a mechanical vector for pathogens due to their feeding habits, as well as their great flying capacity, which may be up to 29 km in 24 h according to laboratory flight mill studies. However, field dispersal studies showed that the flies would travel at least 3 km after 6 days in search of a blood meal [2]. Adult stable flies in a given area are most likely to have originated from larval development sites within a 5 km radius of the subject cattle [117].

9. Control measures of *Stomoxys* flies

Many types of control methods have been tested for stable flies, including insecticides, biological controls, baits, and sterile insect technique [9, 16, 17, 40, 54, 67, 82, 84, 99, 116].

As no single control method is effective in controlling stable fly populations, the use of several vector management strategies for the control of the stable flies is highly recommended. Integrated vector management relies on three tactics for successful suppression of stable flies: sanitation, biological, and chemical controls [7, 75, 96, 128].

Sanitation is the most important method for reduction of stable fly populations in livestock farms. Most common larva sites are piles of decomposing vegetative material or manure, old manure under fences, and poorly drained areas. In confined animal facilities, the highest priority should be to eliminate stable fly breeding sites as much as possible.

Pupal parasitoids in the family Pteromalidae (Hymenoptera) such as *Spalangia* spp. have a high potential for the biological control of stable flies [112]. The parasitoid wasps lay their eggs in immature stable flies. The resulting wasp offspring feed on the stable fly maggot or pupa and eventually kill it. The immature parasitoid wasps will then develop into an adult, emerge from the fly pupa, and repeat its life cycle. Although parasitoid wasps offer some measure of control they do not produce immediate results. Therefore, biological control should not be used alone, but in concert with other methods, such as sanitation.

Many different traps have been used to both survey and control the fly population [57, 116]. Stable flies are attracted to certain olfactory stimuli such as carbon dioxide, ammonia, and phenylpropanoid compounds [50]. They are also attracted to visual stimuli such as fiberglass Alysnyte which reflects near UV light [9], and the blue-colored fabrics used in insecticide impregnated screens [51] or in the Nzi and Vavoua traps [82].

Experiments are now performed to evaluate the association of the ATSB (Attractive Toxic Sugar Bait) method [5, 89] with attractive devices to control flies. The objective is to take advantage of the materials stable flies are attracted to (blue fabric or Alysnyte) and sugar bait with insecticide to kill them.

Experiments are also performed to identify and evaluate the efficiency of potential repellents to protect domestic animals [3, 58, 134, 135].

Table 1. Disease agents associated with *Stomoxys* spp.

Disease agent	Geographic occurrence	Transmission	Association*	References
Viruses				
Equine infectious anemia virus (EIAV)	Worldwide	Mechanical	Experimental and natural transmission, isolation	[44, 56, 110]
African swine fever virus (ASFV)	Africa, Sardinia (Italy)	Mechanical	Experimental transmission	[80]
West Nile Fever virus (WNV)	Worldwide	Mechanical	Experimental transmission, isolation	[36, 66]
Rift Valley Fever virus (RVFV)	Africa, Middle East	Mechanical	Experimental transmission	[59]
Lumpy Skin Disease virus (LSDV)	Africa, Middle East	Mechanical	Experimental transmission, isolation	[22, 68, 80]
Bovine Herpes Virus (BHV)	Worldwide	Mechanical	Experimental transmission	[49]
Bovine Leukosis Virus (BLV)	Worldwide	Mechanical	Experimental transmission	[14, 46, 126]
Vesicular Stomatitis Virus (VSV)	America	Mechanical	Experimental transmission	[39]
Bacteria				
<i>Bacillus anthracis</i>	Worldwide	Mechanical	Experimental and natural transmission	[107, 108]
<i>Pasteurella multocida</i>	Worldwide	Mechanical	Experimental transmission	[92]
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	Worldwide	Mechanical	Experimental transmission	[127]
<i>Francisella tularensis</i>	North America, Europe, northern Africa, Middle East, Asia	Mechanical	Experimental transmission	[95, 125]
<i>Enterobacter sakazakii</i>	Worldwide	Biological and mechanical	Natural transmission, isolation, and development.	[87]
<i>Dermatophilus congolensis</i>	Worldwide	Mechanical	Experimental and natural transmission	[100]
Rickettsia				
<i>Anaplasma marginale</i>	Worldwide (Tropics and subtropics)	Mechanical	Experimental and natural transmission, isolation	[94, 109]
Protozoa				
<i>Trypanosoma evansi</i>	South America, North Africa, Asia, Europe	Mechanical	Experimental transmission	[10, 83, 114]
<i>Trypanosoma vivax</i>	South America, Africa	Mechanical	Experimental transmission	[83]
<i>Trypanosoma brucei</i>	Africa	Mechanical	Experimental transmission, isolation	[83, 85]
<i>Trypanosoma congolense</i>	Africa	Mechanical		[114]
<i>Besnoitia besnoiti</i>	South America, Europe, Africa, Middle East, Asia	Mechanical	Experimental and natural transmission	[8, 77, 78]
<i>Leishmania tropica</i>	North Africa, Middle East, Asia	Mechanical	Experimental transmission	[6]
Helminths				
<i>Habronema microstoma</i>	Worldwide	Biological	Experimental transmission, isolation, and development	[119, 130]

*Association between disease agents and stomoxes is described as follows: isolation (agent isolated from stomoxes), development (as if stomoxes were natural intermediate host), experimental transmission (transmission of agent by unnatural mode of infection or to unnatural host), and natural transmission (transmission of agent from one natural host to another by exposure to stomoxes) according to Krinsky (1976) [73].

If a stable fly problem persists, an insecticide can be used. Many compounds are available to suppress adult and larval stable fly populations. Insecticides applied as residual sprays, such as permethrin, have been applied to the sides of buildings where adult stable flies congregate. However, the persistence of residuals is not predictable over time. Sublethal exposure levels may be found less than one month after application [60] and some stable fly populations have already shown a high degree of resistance [102].

Regardless, integrated pest control should be adapted to the specific conditions of each farm, medium, area, and should be established with synergistic procedures, to get the maximum benefit, as was suggested in La Réunion [11].

10. Conclusion

Table 1 is a summary of the evidence available for incriminating stomoxes as mechanical or biological vectors of the

disease agents discussed in this review. Few studies involving natural transmission or isolation of a pathogen from wild stomoxes have been done. That's why the evidence for considering stomoxes as natural vectors of some of these pathogens is meager. Nonetheless, because of their feeding habits, stomoxes are regarded as important potential mechanical vectors of various microorganisms. It is highly recommended that future research takes these questions into account. In vitro feeding of *Stomoxys* on membranes where they are allowed to pick up infectious disease agents, subsequent study whether the flies remain infected, where the infection retains through dissection and PCR of parts of the flies, are made possible thanks to breeding facilities. Due to its epidemiological importance, the mechanisms of regurgitation of blood by stable flies and its frequency should be further analyzed.

Recent studies carried out on trypanosomes in cattle have shown and quantified the role of tabanids in mechanical transmission. They allowed to develop mathematic model for risk assessment and to predict impact and evolution of prevalence under various circumstances [31–33]. Implementation of research projects on quantitative experimental studies on the capacity of stomoxes for transmission of parasites like *Trypanosoma evansi*, *Besnoitia besnoiti*, and the Blue Tongue Virus/BTV, including immediate/delayed transmission, artificially/naturally interrupted blood feedings, study of behavioral modifications and interactions host/insects, in contention/semi-liberty conditions, with a study of the behavioral modifications of hosts and vectors, in rodents, cattle, or sheep, should allow to develop a mathematical model of transmission of pathogens by stomoxes. The integration of diffusion models of pathogens by hosts (inter-herd transmission) with a synthetic model of transmission by biting insects (intra-herd transmission) will allow generating a global model of diffusion-transmission of pathogens aiming at evaluating risk and predicting disease spreading and prevalence evolution.

We hope that the information given in this review will stimulate more research on vector competence and capacity and on control of those Stomoxyine flies.

Acknowledgements. This project was supported by the Thailand Research Fund Organization through the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (Grant No. PHD/0037/2549), the Senior Research Scholar Program (RTA5280002), and the Kasetsart University Research and Development Institute. We thank Sabrina White for the proof-reading and her constructive comments on this manuscript. This publication was sponsored by Société Française de Parasitologie (fee waiver for reviews in 2013). Anonymous reviewers are also thanked for improvement of the manuscript.

References

1. Abu-Samra MT. 1980. The epizootiology of *Dermatophilus congolensis* infection. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, 33, 23–32.
2. Bailey DL, Whitfield TL, Smittle BJ. 1973. Flight dispersal of stable fly. *Journal of Economic Entomology*, 66, 410–411.
3. Baldacchino F, Tramut C, Salem A, Liénard E, Delétré E, Franc M, Martin T, Duvallet G, Jay-Robert P. 2013. The repellency of lemongrass oil against stable flies tested using video tracking. *Parasite*, 20, 21.
4. Barré N. 1981. Les stomoxes ou « mouches bœufs » à la réunion. Pouvoir pathogène, écologie, moyen de lutte. GERDAT-IEMVT: Maisons-Alfort, France.
5. Beier JC, Müller GC, Gu W, Arheart KL, Schlein Y. 2012. Attractive toxic sugar bait (ATSB) methods decimate populations of *Anopheles* malaria vectors in arid environments regardless of the local availability of favoured sugar-source blossoms. *Malaria Journal*, 11, 31.
6. Berberian DA. 1938. Successful transmission of cutaneous leishmaniasis by the bites of *Stomoxys calcitrans*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 38, 254–256.
7. Betke P, Schultka H, Ribbeck R. 1986. A *Stomoxys calcitrans* outbreak on a dairy farm. *Angewandte Parasitologie*, 27, 39–44.
8. Bigalke RD. 1968. New concepts on the epidemiological features of bovine besnoitiosis as determined by laboratory and field investigations. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 35, 3–137.
9. Black WC, Krafur ES. 1985. Use of sticky traps to investigate seasonal trends in the spatial distribution of house flies and stable flies (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology*, 22, 550–557.
10. Bouet G, Roubaud E. 1912. Expériences de transmission des trypanosomiasés animales d'Afrique occidentale française par les stomoxes. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 5, 544–550.
11. Bouyer J, Grimaud Y, Pannequin M, Esnault O, Desquesnes M. 2011. Importance épidémiologique et contrôle des stomoxes à la Réunion. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation n° spécial DOM-TOM*, 43, 53–58.
12. Brun R, Hecker H, Lun Z-R. 1998. *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). *Veterinary Parasitology*, 79, 95–107.
13. Butler JF, Kloft WJ, Dubose LA, Kloft ES. 1977. Recontamination of food after feeding a ³²P food source to biting Muscidae. *Journal of Medical Entomology*, 27, 874–877.
14. Buxton BA, Hinkle NC, Schultz RD. 1985. Role of insects in the transmission of bovine leukosis virus: potential for transmission by stable flies, horn flies, and tabanids. *American Journal of Veterinary Research*, 46, 123–126.
15. Byrne BA, Rand CL, McElliott VR, Samitz EM, Brault SA. 2010. Atypical *Dermatophilus congolensis* infection in a three-year-old pony. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22, 141–143.
16. Campbell JB, Hermanussen JF. 1971. Efficacy of insecticides and methods of insecticidal application for control of stable flies in Nebraska. *Journal of Economic Entomology*, 64, 1188–1190.
17. Campbell JB, Wright JE. 1976. Field evaluations of insect growth regulators, insecticides, and a bacterial agent for stable fly control in feedlot breeding areas. *Journal of Economic Entomology*, 69, 566–568.
18. Campbell JB, Skoda SR, Berkebile DR, Boxler DJ, Thomas GD, Adams DC, Davis R. 2001. Effects of stable flies (Diptera: Muscidae) on weight gains of grazing yearling cattle. *Journal of Economic Entomology*, 94, 780–783.
19. Cam VM. 1996. The role of dipterous insects in the mechanical transmission of animal viruses. *British Veterinary Journal*, 152, 377–393.

20. Chartier C, Itard J, Morel P, Troncy P. 2000. Précis de parasitologie vétérinaire tropicale. Ed. Tec et Doc & Ed. Médicales internationales Universités francophones: Paris.
21. Chevalier V, Pépin M, Plée L, Lancelot R. 2010. Rift Valley fever—a threat for Europe? *Euro Surveill*, 15, 19506.
22. Chihota CM, Rennie LF, Kitching RP, Mellor PS. 2003. Attempted mechanical transmission of lumpy skin disease virus by biting insects. *Medical and Veterinary Entomology*, 17, 294–300.
23. Coronado A, Butler JF, Becnel J, Hogsette J. 2004. Artificial feeding in the stable fly *Stomoxys calcitrans* and their relationship with the blood meal destination. Proceedings of the 1st international symposium and 2nd national symposium on Haemoparasites and their vectors, Simon Bolivar University (USB), Caracas, Venezuela, 14-16 October 2004.
24. Costard S, Wieland B, De Glanville W, Jori F, Rowlands R, Vosloo W, Roger F, Pfeiffer DU, Dixon LK. 2009. African swine fever: how can global spread be prevented? *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 364, 2683–2696.
25. Cuglovici DA, Bartholomeu DC, Reis-Cunha JL, Carvalho AU, Ribeiro MF. 2010. Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 169, 320–326.
26. Cutler SJ, Bouzid M, Cutler RR. 2007. Q fever. *Journal of Infection*, 54, 313–318.
27. Davies FG. 1991. Lumpy skin disease of cattle: a growing problem in Africa and the Near East. *World Animal Review*, 68, 37–42.
28. De Castro BG, De Souza MMS, Bittencourt AJ. 2007. Aerobic bacterial microbiota in *Stomoxys calcitrans*: preliminary studies in Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 16, 193–197.
29. De La Fuente J, Naranjo V, Ruiz-Fons F, Höfle U, Fernández De Mera IG, Villanúa D, Almazán C, Torina A, Caracappa S, Kocan KM, Gortázar C. 2005. Potential vertebrate reservoir hosts and invertebrate vectors of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in central Spain. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, 5, 390–401.
30. Desquesnes M. 2004. Livestock trypanosomes and their vectors in Latin America. CIRAD-EMVT publication: OIE, Paris, ISBN 92-9044-634-X. <http://www.oie.int/doc/ged/D9818.PDF>
31. Desquesnes M, Dia ML. 2003. Mechanical transmission of *Trypanosoma congolense* in cattle by the African tabanid *Atylotus agrestis*. *Experimental Parasitology*, 105, 226–231.
32. Desquesnes M, Dia ML. 2003. *Trypanosoma vivax*: mechanical transmission in cattle by one of the most common African tabanids, *Atylotus agrestis*. *Experimental Parasitology*, 103, 35–43.
33. Desquesnes M, Dia ML. 2004. Mechanical transmission of *Trypanosoma vivax* in cattle by the African tabanid *Atylotus fuscipes*. *Veterinary Parasitology*, 119, 9–19.
34. Desquesnes M, Bossard G, Patrel D, Herder S, Patout O, Lepetitcolin E, Thevenon S, Berthier D, Pavlovic D, Brugidou R, Jacquier P, Schelcher F, Faye B, Touratier L, Cuny G. 2008. First outbreak of *Trypanosoma evansi* in camels in metropolitan France. *Veterinary Record*, 162, 750–752.
35. Desquesnes M, Biteau-Coroller F, Bouyer J, Dia ML, Foil L. 2009. Development of a mathematical model for mechanical transmission of trypanosomes and other pathogens of cattle transmitted by tabanids. *International Journal of Parasitology*, 39, 333–346.
36. Doyle MS, Swope BN, Hogsette JA, Burkhalter KL, Savage HM, Nasci RS. 2011. Vector competence of the stable fly (Diptera: Muscidae) for West Nile virus. *Journal of Medical Entomology*, 48, 656–668.
37. Elkan PW, Parnell R, Smith JLD. 2009. A die-off of large ungulates following a *Stomoxys* biting fly out-break in lowland forest, northern Republic of Congo. *African Journal of Ecology*, 47, 528–536.
38. Ferenc SA, Raymond HL, Lancelot R, Courtney CH. 1988. Mechanical transmission of South American *Trypanosoma vivax* by the tabanid *Cryptotylus unicolor*. Proceedings of the 18th international congress of entomology, University of Florida: Gainesville, p. 295, 16p.
39. Ferris DH, Hanson RP, Dicke RJ, Roberts RH. 1955. Experimental transmission of vesicular stomatitis virus by Diptera. *Journal of Infectious Diseases*, 96, 184–192.
40. Floate KD, Spooner RW, Colwell DD. 2001. Larvicidal activity of endectocides against pest flies in the dung of treated cattle. *Medical and Veterinary Entomology*, 15, 117–120.
41. Foil LD. 1989. Tabanids as vectors of disease agents. *Parasitology Today*, 5, 88–96.
42. Foil LD, Gorham JR. 2000. Mechanical transmission of disease agents by arthropods. *Medical Entomology: a textbook on public health and veterinary problems caused by arthropods*. Kluwer Academic Publishers, 461–514
43. Foil LD, Hogsette JA. 1994. Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies. *Revue scientifique et technique de l'Office international des epizooties*, 13, 1125–1158.
44. Foil LD, Meek CL, Adams WV, Issel CJ. 1983. Mechanical transmission of equine infectious anemia virus by deer flies (*Chrysops flavidus*) and stable flies (*Stomoxys calcitrans*). *American Journal of Veterinary Research*, 44, 155–156.
45. Foil LD, Seger CL, French DD, Issel CJ, McManus JM, Ohrberg CL, Ramsey RT. 1988. Mechanical transmission of bovine leukemia virus by horse flies (Diptera: Tabanidae). *Journal of Medical Entomology*, 25, 374–376.
46. Freitas TR, Romero CH. 1991. Experimental transmission of bovine leukosis virus by leucocytes recovered from the stable fly *Stomoxys calcitrans* L. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 24, 1017–1023.
47. Gibbs EP. 1973. Experimental studies of the epidemiology of bovine herpes mammillitis. *Research in Veterinary Science*, 14, 139–144.
48. Gibbs EP, Johnson RH, Osborne AD. 1972. Field observations on the epidemiology of bovine herpes mammillitis. *Veterinary Record*, 91, 395–401.
49. Gibbs EP, Johnson RH, Gatehouse AG. 1973. A laboratory technique for studying the mechanical transmission of bovine herpes mammillitis virus by the stable fly (*Stomoxys calcitrans* L.). *Research in Veterinary Science*, 14, 145–147.
50. Gibson G, Torr SJ. 1999. Visual and olfactory responses of haematophagous Diptera to host stimuli. *Medical and Veterinary Entomology*, 13, 2–23.
51. Gouteux JP, Challier A, Laveissiere C, Couret D. 1982. The use of screens in the anti-tsetse campaign in the forest zone. *Tropenmedizin und Parasitologie*, 33, 163–168.
52. Green BE, Foil LD, Hagius SD, Issel CJ. 1996. Stability of equine infectious anemia virus in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae), and *Tabanus fuscicostatus* (Diptera: Tabanidae) stored at –70 degrees C. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 12, 334–336.

53. Guglielmo AA. 1995. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Veterinary Parasitology*, 57, 109–119.
54. Guglielmo AA, Volpogni MM, Quaino OR, Anziani OS, Mangold AJ. 2004. Abundance of stable flies on heifers treated for control of horn flies with organophosphate impregnated ear tags. *Medical and Veterinary Entomology*, 18, 10–13.
55. Gutierrez C, Desquesnes M, Touratier L, Büsche P. 2010. *Trypanosoma evansi*: recent outbreaks in Europe. *Veterinary Parasitology*, 174, 26–29.
56. Hawkins JA, Adams WV, Cook L, Wilson BH, Roth EE. 1973. Role of horse fly (*Tabanus fuscicostatus* Hine) and stable fly (*Stomoxys calcitrans* L.) in transmission of equine infectious anemia to ponies in Louisiana. *American Journal of Veterinary Research*, 34, 1583–1586.
57. Heath AC. 2002. Distribution, seasonality and relative abundance of *Stomoxys calcitrans* (stablefly) (Diptera: Muscidae) in New Zealand. *New-Zealand Veterinary Journal*, 50, 93–98.
58. Hieu TT, Kim SI, Lee SG, Ahn YJ. 2010. Repellency to *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) of plant essential oils alone or in combination with *Calophyllum inophyllum* nut oil. *Journal of Medical Entomology*, 47, 575–580.
59. Hoch AL, Gargan TP, Bailey CL. 1985. Mechanical transmission of Rift Valley fever virus by hematophagous Diptera. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 34, 188–193.
60. Hogsette JA, Ruff JP, Jones CJ. 1987. Stable fly biology and control in northwest Florida. *Journal of Agricultural Entomology*, 4, 1–11.
61. Hucko M. 1984. The role of the housefly (*Musca domestica*) in the transmission of *Coxiella burnetii*. *Folia Parasitologica (Praha)*, 31, 177–181.
62. Hugh-Jones M, Blackburn J. 2009. The ecology of *Bacillus anthracis*. *Molecular Aspects of Medicine*, 30, 356–367.
63. Issel CJ, Foil LD. 1984. Studies on equine infectious anemia virus transmission by insects. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 184, 293.
64. Issel C, Rushlow K, Foil LD, Montelaro RC. 1988. A perspective on equine infectious anemia with an emphasis on vector transmission and genetic analysis. *Veterinary Microbiology*, 17, 251–286.
65. Jacquiet P, Liénard E, Franc M. 2010. Bovine besnoitiosis: epidemiological and clinical aspects. *Veterinary Parasitology*, 174, 30–36.
66. Johnson G, Panella N, Hale K, Komar N. 2010. Detection of West Nile virus in stable flies (Diptera: Muscidae) parasitizing juvenile American white pelicans. *Journal of Medical Entomology*, 47, 1205–1211.
67. Kaufman PE, Rutz DA, Frisch S. 2005. Large sticky traps for capturing house flies and stable flies in dairy calf greenhouse facilities. *Journal of Dairy Science*, 88, 176–181.
68. Kitching RP, Mellor PS. 1986. Insect transmission of capripoxvirus. *Research in Veterinary Science*, 40, 255–258.
69. Kitching RP, Taylor WP. 1985. Transmission of capripoxvirus. *Research in Veterinary Science*, 39, 196–199.
70. Kocan KM, de la Fuente J, Guglielmo AA, Meléndez RD. 2003. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 698–712.
71. Kramer LD, Bernard KA. 2001. West Nile virus in the western hemisphere. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 14, 519–525.
72. Kramer LD, Styer LM, Ebel GD. 2008. A global perspective on the epidemiology of West Nile virus. *Annual Review of Entomology*, 53, 61–81.
73. Krinsky WL. 1976. Animal disease agents transmitted by horse flies and deer flies (Diptera: Tabanidae). *Journal of Medical Entomology*, 13, 225–275.
74. Kunz SE, 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.
75. LaBrecque GC, Patterson RS, Williams DF, Weidhaas DE. 1981. Control of the stable fly, *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae), on St. Croix, U.S. Virgin Islands, using integrated pest management measures I. Feasibility of sterile male releases. *Journal of Medical Entomology*, 18, 194–196.
76. Leroux C, Cadore J-L, Montelaro RC. 2004. Equine infectious anemia virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? *Veterinary Research*, 35, 485–512.
77. Liénard E, Salem A, Grisez C, Prévot F, Bergeaud JP, Franc M, Gottstein B, Alzieu JP, Lagalisse Y, Jacquiet P. 2010. A longitudinal study of *Besnoitia besnoiti* infections and seasonal abundance of *Stomoxys calcitrans* in a dairy cattle farm of southwest France. *Veterinary Parasitology*, 177, 20–27.
78. Liénard E, Salem A, Jacquiet P, Grisez C, Prévot F, Blanchard B, Bouhsira E, Franc M. 2013. Development of a protocol testing the ability of *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) to transmit *Besnoitia besnoiti* (Henry, 1913) (Apicomplexa: Sarcocystidae). *Parasitology Research*, 112, 479–486.
79. Macadam I. 1977. Control of *Dermatophilus congolensis* infection. *Veterinary Record*, 100, 411.
80. Mellor PS, Kitching RP, Wilkinson PJ. 1987. Mechanical transmission of capripox virus and African swine fever virus by *Stomoxys calcitrans*. *Research in Veterinary Science*, 43, 109–112.
81. Meyer JA, Petersen JJ. 1983. Characterization and seasonal distribution of breeding sites of stable flies and house flies (Diptera: Muscidae) on eastern Nebraska feedlot and dairies. *Journal of Economic Entomology*, 76, 103–108.
82. Mihok S, Carlson DA. 2007. Performance of painted plywood and cloth Nzi traps relative to Manitoba and Greenhead traps for tabanids and stable flies. *Journal of Economic Entomology*, 100, 613–618.
83. Mihok S, Maramba O, Munyoki E, Kagoiya J. 1995. Mechanical transmission of *Trypanosoma* spp. by African Stomoxyinae (Diptera: Muscidae). *Tropical Medicine and Parasitology*, 46, 103–105.
84. Mihok S, Carlson DA, Ndegwa N. 2007. Tsetse and other biting fly responses to Nzi traps baited with octenol, phenols and acetone. *Medical and Veterinary Entomology*, 21, 70–84.
85. Mohammed YO, Mohamed-Ahmed MM, Lubna TK, El Rayah IE. 2010. Detection of *Trypanosoma brucei gambiense* and *T. b. rhodesiense* in *Glossina fuscipes fuscipes* (Diptera: Glossinidae) and *Stomoxys* flies using the polymerase chain reaction (PCR) technique in southern Sudan. *African Journal of Biotechnology*, 9, 6408–6412.
86. Montgomery RE. 1921. On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony). *Journal of Comparative Pathology*, 34, 159–191.
87. Mramba F, Broce AB, Zurek L. 2007. Vector competence of stable flies, *Stomoxys calcitrans* L. (Diptera: Muscidae), for

- Enterobacter sakazakii*. Journal of Vector Ecology, 32, 134–139.
88. Mullens BA, Lii KS, Meyer JA, Peterson NG, Szijj CE. 2006. Behavioural responses of dairy cattle to the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, in an open field environment. Medical and Veterinary Entomology, 20, 122–137.
 89. Muller GC, Hogsette JA, Beier JC, Traore SF, Toure MB, Traore MM, Bah S, Doumbia S, Schlein Y. 2012. Attraction of *Stomoxys sp.* to various fruits and flowers in Mali. Medical and Veterinary Entomology, 26, 178–187.
 90. Nelder MP, Lloyd JE, Loftis AD, Reeves WK. 2008. *Coxiella burnetii* in wild-caught filth flies. Emerging Infectious Diseases, 14, 1002–1004.
 91. Newson HD. 1977. Arthropod problems in recreation areas. Annual Review of Entomology, 22, 333–353.
 92. Nieschulz O, Kraneveld FC. 1929. Experimentelle Untersuchungen über die Uebertragung der Büffelseuche durch Insekten. Zentralblatt Fur Bakteriologie Parasitenkunde, 113, 403–417.
 93. Oliveira JB, Hernández-Gamboa J, Jiménez-Alfaro C, Zeledón R, Blandón M, Urbina A. 2009. First report of *Trypanosoma vivax* infection in dairy cattle from Costa Rica. Veterinary Parasitology, 163, 136–139.
 94. Oliveira JB, Montoya J, Romero JJ, Urbina A, Soto-Barrientos N, Melo ESP, Ramos CAN, Araújo FR. 2011. Epidemiology of bovine anaplasmosis in dairy herds from Costa Rica. Veterinary Parasitology, 177, 359–365.
 95. Olsufiev NG. 1940. The role of *Stomoxys calcitrans* L. in the transmission and preservation of the tularemia infection. Arkhiv biologicheskikh nauk, 58, 25–31.
 96. Patterson RS, LaBrecque GC, Williams DF, Weidhaas DE. 1981. Control of the stable fly, *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae), on St. Croix, U.S. Virgin Islands, using integrated pest management measures III. Field techniques and population control. Journal of Medical Entomology, 18, 203–210.
 97. Penrith ML, Thomson GR, Bastos ADS. 2005. African swine fever. Infectious Diseases of Livestock. Oxford University Press.
 98. Plowright W, Thomson GR, Nester JA. 1994. African swine fever. Infectious Diseases of Livestock. Oxford University Press.
 99. Ratcliffe ST, Robertson HM, Jones CJ, Bollero GA, Weinzierl RA. 2002. Assessment of parasitism of house fly and stable fly (Diptera: Muscidae) pupae by Pteromalid (Hymenoptera: Pteromalidae) parasitoids using a polymerase chain reaction assay. Journal of Medical Entomology, 39, 52–60.
 100. Richard JL, Pier AC. 1966. Transmission of *Dermatophilus congolensis* by *Stomoxys calcitrans* and *Musca domestica*. American Journal of Veterinary Research, 27, 419–423.
 101. Roberts LW, Wellde BT, Reardon MJ, Onyango FK. 1989. Mechanical transmission of *Trypanosoma brucei rhodesiense* by *Glossina morsitans morsitans* (Diptera: Glossinidae). Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 83, 127–131.
 102. Salem A, Bouhsira E, Liénard E, Bousquet Melou A, Jacquet P, Franc M. 2012. Susceptibility of two European strains of *Stomoxys calcitrans* (L.) to Cypermethrin, Deltamethrin, Fenvalerate, λ -cyhalothrin, Permethrin and Phoxim. International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine, 10, 249–257.
 103. Salem A, Franc M, Jacquet P, Bouhsira E, Liénard E. 2012. Feeding and breeding aspects of *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) under laboratory conditions. Parasite, 19, 309–317.
 104. Schares G, Basso W, Majzoub M, Costes HC, Rostaher A, Semair J, Hermanns W, Conraths FJ, Gollnick NS. 2009. First in vitro isolation of *Besnoitia besnoiti* from chronically infected cattle in Germany. Veterinary Parasitology, 163, 31–32.
 105. Schofield S, Torr SJ. 2002. A comparison of the feeding behavior of tsetse and stable flies. Medical and Veterinary Entomology, 16, 177–185.
 106. Schowalter TD, Klownden MJ. 1979. Blood meal size of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, measured by the HiCN method. Mosquito News, 39, 110–112.
 107. Schuberg A, Boing W. 1914. Ueber die Uebertragung von Krankheiten durch einheimische stechende Insekten (On the transmission of diseases by indigenous biting insects). Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte, 48, 491–512.
 108. Schuberg A, Kuhn M. 1912. Ueber die Uebertragung von Krankheiten durch einheimische stechende Insekten (On the transmission of diseases by indigenous biting insects). Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte, 40, 209–234.
 109. Scoles GA, Broce AB, Lysyk TJ, Palmer GH. 2005. Relative efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) compared with mechanical transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). Journal of Medical Entomology, 42, 668–675.
 110. Scott JW. 1922. Insect transmission of swamp fever or infectious anemia in horses. University of Wyoming Agricultural Experiment Station Bulletin, 57–137.
 111. Široký P, Kubelová M, Modrý D, Erhart J, Literák I, Špitalska E, Kocianová E. 2010. Tortoise tick *Hyalomma aegyptium* as long term carrier of Q fever agent *Coxiella burnetii* - evidence from experimental infection. Parasitological Research, 107, 1515–1520.
 112. Skovgard H, Steenberg T. 2002. Activity of pupal parasitoids of the stable fly *Stomoxys calcitrans* and prevalence of entomopathogenic fungi in the stable fly and the house fly *Musca domestica* in Denmark. BioControl, 47, 45–60.
 113. Smith PF, Howerth EW, Carter D, Gray EW, Noblet R, Mead DG. 2009. Mechanical transmission of vesicular stomatitis New Jersey virus by *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) to domestic swine (*Sus scrofa*). Journal of Medical Entomology, 46, 1537–1540.
 114. Sumba AL, Mihok S, Oyieke FA. 1998. Mechanical transmission of *Trypanosoma evansi* and *T. congolense* by *Stomoxys niger* and *S. taeniatus* in a laboratory mouse model. Medical and Veterinary Entomology, 12, 417–422.
 115. Swist SL, Wilkerson MJ, Wyatt CR, Broce AB, Kanost MR. 2002. Modulation of bovine lymphocyte responses by salivary gland extract of the stable fly, *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). Journal of Medical Entomology, 39, 900–907.
 116. Taylor DB, Berkebile DR. 2006. Comparative efficiency of six stable fly traps. Journal of Economic Entomology, 99, 1415–1419.
 117. Taylor DB, Moon RD, Campbell JB, Berkebile DR, Scholl PJ, Broce AB, Hogsette JA. 2010. Dispersal of stable flies (Diptera: Muscidae) from larval development sites in a Nebraska landscape. Environmental Entomology, 39, 1101–1110.
 118. Traversa D, Iorio R, Petrizzi L, De Amicis I, Brandt S, Meana A, Giangaspero A, Otranto D. 2007. Molecular diagnosis of equid summer sores. Veterinary Parasitology, 150, 116–121.

**Annexe 2. Agents pathogènes associés aux Tabanidae (d'après
Krinsky *et al.* 1976**

Table A. Disease agents associated with tabanids (updated from Krinsky 1976) [1]

Disease agents	Vectors	Geographic occurrence	Transmission	Association*	References
Viruses					
Equine infectious anemia virus	<i>Tabanus</i> spp., <i>Hybomitra</i> spp., <i>Chrysops</i> spp.	Worldwide	Mechanical	Experimental and natural transmission; Isolation	[2-6]
Bovine leukosis virus	<i>Tabanus</i> spp.	Worldwide	Mechanical	Experimental and natural transmission	[7-10]
Bovine viral diarrhea virus	<i>Haematopota pluvialis</i>	Worldwide	Mechanical	Natural transmission	[11]
Hog cholera virus	<i>Tabanus</i> spp.	Worldwide	Mechanical	Experimental transmission	[12]
Vesicular stomatitis virus	<i>Tabanus</i> spp., <i>Chrysops</i> spp.	America	Mechanical	Experimental transmission	[13]
Rinderpest virus	<i>Tabanus orientis</i>	Eradicated worldwide in 2011	Mechanical	Natural transmission	[14]
California encephalitis viruses	<i>Hybomitra lasiophtalma</i> , <i>Chrysops</i> spp.	North America	Unknown	Isolation	[15,16]
Western equine encephalitis virus	<i>Tabanus nigrovittatus</i>	North America	Unknown	Isolation	[17]
Tick-borne encephalitis virus	<i>Tabanus flavicornis</i>	Asia and Europe	Unknown	Isolation	[18]
Influenza virus	<i>Atylotus agrestis</i>	Worldwide	Unknown	Isolation	[19]
Bacteria/ rickettsia					
<i>Anaplasma marginale</i>	<i>Tabanus</i> spp., <i>Chrysops</i> spp.	Worldwide (tropics, subtropics)	Mechanical	Experimental and natural transmission; Isolation	[20-27]
<i>Francisella tularensis</i>	<i>Chrysops</i> spp., <i>Tabanus</i> spp., <i>Haematopota</i> spp.	Northern hemisphere	Mechanical	Experimental and natural transmission; Isolation	[28-33]
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Tabanus</i> spp., <i>Haematopota pluvialis</i> , <i>Chrysops</i> spp.	Worldwide	Mechanical	Experimental and natural transmission. Isolation	[34-36]
<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>Chrysops</i> spp., <i>Hybomitra</i> spp., <i>Tabanus</i> spp.	Northern hemisphere	Unknown	Isolation	[37]
<i>Coxiella burnetii</i>	<i>Tabanus staegeri</i>	Worldwide	Unknown	Isolation	[38]
<i>Clostridium chauvoei</i>	<i>Tabanus rubidus</i>	Worldwide	Mechanical	Experimental transmission	[39]
<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Tabanus</i> spp., <i>Chrysops dispar</i>	Worldwide	Mechanical	Experimental transmission	[40]
<i>Brucella</i> spp.	<i>Haematopota</i> spp., <i>Hybomitra solstitialis</i> , <i>Tabanus</i> spp., <i>Heptatoma pellucens</i>	Worldwide	Mechanical	Experimental transmission	[41]
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Haematopota pallens</i> , <i>Hybomitra</i> spp., <i>Tabanus</i> spp.	Worldwide	Mechanical	Experimental transmission	[42,43]
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	<i>Haematopota pluvialis</i> , <i>Tabanus bromius</i> , <i>Heptatoma pellucens</i>	Worldwide	Mechanical	Experimental transmission	[44]
<i>Ehrlichia risticii</i>	<i>Chrysops vittatus</i> , <i>Tabanus</i> spp.	North America	Mechanical	Experimental transmission	[45]
Protozoa					
<i>Besnoitia besnoiti</i>	<i>Tabanus taeniola</i> , <i>Atylotus nigromaculatus</i> , <i>Tabanocella denticornis</i> , <i>Haematopota</i> spp.	South America, Europe, Africa, Middle-East, Asia	Mechanical	Experimental and natural transmission	[46]
<i>Trypanosoma evansi</i>	<i>Tabanus</i> spp., <i>Haematopota</i> spp., <i>Chrysops</i> spp., <i>Ancala</i> spp., <i>Atylotus</i> spp.	South America, North Africa, Asia, Europe	Mechanical	Experimental and natural transmission	[47-58]
<i>Trypanosoma vivax</i>	<i>Tabanus</i> spp., <i>Atylotus</i> spp., <i>Cryptotylus unicolor</i>	South America, Africa	Mechanical	Natural transmission	[59-64]
<i>Trypanosoma theileri</i>	<i>Haematopota</i> spp., <i>Tabanus</i> spp., <i>Hybomitra</i> spp.	Worldwide	Mechanical and biological	Experimental and natural transmission; Isolation and development	[65-71]
<i>Trypanosoma equiperdum</i>	<i>Atylotus tomentosus</i>	Worldwide	Mechanical	Experimental transmission	[72]
<i>Trypanosoma brucei</i>	<i>Atylotus nemoralis</i> , <i>Tabanus</i> spp., <i>Haematopota</i> spp.	Africa	Mechanical	Experimental transmission; Isolation	[72,73]
<i>Trypanosoma congolense</i>	<i>Atylotus agrestis</i>	Africa	Mechanical	Natural transmission	[59]
<i>Haemoproteus metchnikovi</i>	<i>Chrysops callidus</i>	Worldwide	Mechanical and biological	Experimental transmission; Isolation and development	[74]

Filarial nematodes					
<i>Loa Loa</i>	<i>Chrysops</i> spp.	Central Africa	Biological	Experimental and natural transmission; Isolation and development	[75-83]
<i>Elaeophora schneideri</i>	<i>Hybomitra</i> spp., <i>Tabanus</i> spp.	North America, Europe	Biological	Experimental transmission; Isolation and development	[84-87]
<i>Dirofilaria repens</i>	<i>Haematopota variegata</i>	Africa, Asia, Europe	Biological	Development	[88]
<i>Dirofilaria roemeri</i>	<i>Tabanus</i> spp., <i>Dasybasis</i> spp.	Australia	Biological	Experimental transmission; Isolation and development	[89]

*Association between disease agents and tabanids is described as follows: isolation (agent isolated from tabanids), development (as if tabanids were natural intermediate host), experimental transmission (transmission of agent by unnatural mode of infection or to unnatural host), and natural transmission (transmission of agent from one natural host to another by exposure to tabanids) according to Krinsky [1].

References of the Table A

1. Krinsky WL (1976) Animal-disease agents transmitted by horse flies and deer flies (Diptera, Tabanidae). *Journal of Medical Entomology* 13: 225-275.
2. Foil LD, Meek CL, Adams WV, Issel CJ (1983) Mechanical transmission of equine infectious anemia virus by deer flies (*Chrysops flavidus*) and stable flies (*Stomoxys calcitrans*). *Am J Vet Res* 44: 155-156.
3. Hawkins JA, Adams WV, Cook L, Wilson BH, Roth EE (1973) Role of horse fly (*Tabanus fuscicostatus* Hine) and stable fly (*Stomoxys calcitrans* L.) in transmission of equine infectious anemia to ponies in Louisiana. *Am J Vet Res* 34: 1583-1586.
4. Stein, D. C, Lotze JC, Mott LO (1942) Transmission of equine infectious anemia by the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, the horse fly, *Tabanidus sulcifrons* (Macquart) and by injection of minute amounts of virus. *AM J Vet Res.* pp. 183-193.
5. Kemen MJ, McClain DS, Matthyse JG (1978) Role of horse flies in transmission of equine infectious anemia from carrier ponies. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 172: 360-362.
6. Scott JW (1922) Insect transmission of swamp fever or infectious anemia of horses. *Wyoming Agricultural Experiment Station Bulletin.* 57-137 p.
7. Buxton BA, Hinkle NC, Schultz RD (1985) Role of insects in the transmission of bovine leukosis virus: potential for transmission by stable flies, horn flies, and tabanids. *Am J Vet Res* 46: 123-126.
8. Hasselschwert DL, French DD, Hribar LJ, Luther DG, Leprince DJ, et al. (1993) Relative susceptibility of beef and Dairy calves to infection by bovine leukemia virus via tabanid (Diptera, Tabanidae) feeding. *Journal of Medical Entomology* 30: 472-473.
9. Foil LD, Seger CL, French DD, Issel CJ, McManus JM, et al. (1988) Mechanical transmission of bovine leukemia virus by horse flies (Diptera, Tabanidae). *Journal of Medical Entomology* 25: 374-376.
10. Perino LJ, Wright RE, Hoppe KL, Fulton RW (1990) Bovine leukosis virus transmission with mouthparts from *Tabanus abactor* after interrupted feeding. *American Journal of Veterinary Research* 51: 1167-1169.
11. Tarry DW, Bernal L, Edwards S (1991) Transmission of bovine virus diarrhea by blood feeding flies. *Veterinary Record* 128: 82-84.
12. Tidwell, A. M, Dean WD, Tidwell MA, Combs GP, et al. (1972) Transmission of hog cholera virus by horseflies. 33: 615-622.
13. Ferris DH, Hanson RP, Dicke RJ, Roberts RH (1955) Experimental transmission of vesicular stomatitis virus by Diptera. *Journal of Infectious Diseases* 96: 184-192.
14. Bhatia, L. H (1935) The role of *Tabanus orientis* and *Stomoxys calcitrans* in the mechanical transmission of rinderpest. *Indian Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry* 5: 2-22.
15. DeFoliart, R. G, Anslow RO, Hanson RP, Morris CD, et al. (1969) Isolation of Jamestown Canyon serotype of California encephalitis virus from naturally infected *Aedes* mosquitoes and tabanids. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 18: 440-447.
16. Miller BR, Kloter KO, Beaty BJ, Magnarelli LA (1983) Nonreplication of Jamestown Canyon and Keystone (California group) viruses in tabanids (Diptera, Tabanidae). *Journal of Medical Entomology* 20: 214-215.
17. Goldfield, M., Sussman O, Gusciora W, Kerlin R, et al. Arbovirus activity in New Jersey during 1967. In: Assoc. NJME, editor; 1968. pp. 14-19.
18. Yagodinsky VN, Skvortsov BI (1962) [On the question of epidemiology and incidence of tick-borne encephalitis by unknown means of infection]. *Avtoref Kratk Soobshch Ob'edinen 7 Sess Inst Polio Virus Entsef AMN SSR Beloruss Inst Epidem Mikrobiol Gig (Minsk):* 169-170.
19. Zhanseitova MT, Shuratov I, Drobishchenko NI, Chizhov AV (1982) Isolation of influenza viruses from bloodsucking arthropods in Kazakhstan. *Izv Akad Nauk Kaz SSR Ser Biol* 3: 57-59.
20. Abramov, I.V., O.F., Grobov (1968) Transmission of the agent of bovine anaplasmosis (*Anaplasma marginale* Theiler 1910) by Tabanidae. Preliminary communication. In: Levine ND, editor. *Natural nidity of diseases and questions of parasitology.* Urbana: University of Illinois Press. pp. 158.

21. Hornok S, Foeldvari G, Elek V, Naranjo V, Farkas R, et al. (2008) Molecular identification of *Anaplasma marginale* and rickettsial endosymbionts in blood-sucking flies (Diptera : Tabanidae, Muscidae) and hard ticks (Acari : Ixodidae). *Veterinary Parasitology* 154: 354-359.
22. Sanborn, E. C, Stiles GW, Moe LH (1932) Preliminary experiments in the transmission of anaplasmosis by Horseflies. *Oklahoma Agr Exp Sta Bull* 204.
23. Scoles GA, Miller JA, Foil LD (2008) Comparison of the efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales : Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* Stiles (Acari : Ixodidae) with mechanical transmission by the horse fly, *Tabanus fuscicostatus* Hine (Diptera : Muscidae). *Journal of Medical Entomology* 45: 109-114.
24. Roberts RH, Love JN (1977) Infectivity of *Anaplasma marginale* after ingestion by potential insect vectors. *American Journal of Veterinary Research* 38: 1629-1630.
25. Wilson BH, Meyer RB (1966) Transmission studies of bovine anaplasmosis with horse flies *Tabanus fuscicostatus* and *Tabanus nigrovittatus*. *American Journal of Veterinary Research* 27: 367-369.
26. Lotze, C. J, Yiengst MJ (1941) Mechanical transmission of bovine anaplasmosis by the horsefly *Tabanus sulcifrons* American *Journal of Veterinary Research* 2: 323-326.
27. Hawkins JA, Love JN, Hidalgo RJ (1982) Mechanical transmission of Anaplasmosis by tabanids (Diptera, Tabanidae). *American Journal of Veterinary Research* 43: 732-734.
28. Cox KB (1965) Tularemia and deer flies in the environs of Utah Lake, Utah. *The Great Basin Naturalist* 25: 13-29.
29. Olsufiev, G. N, Golov DA (1936) Horse flies as transmitters and conservators of tularemia. *Animaux Pathogènes Sect Parasitol* 2: 187-226.
30. Philip CB (1968) Overlap between Nearctic and Neo-tropical faunas of Tabanidae in western North America (Diptera). *Pan-Pacific Entomologist* 44: 332-335.
31. Francis E, Mayne B (1921) Experimental transmission of tularemia by flies of the species *Chrysops discalis*. *Public Health Reports* 36: 1738-1746.
32. Klock LE, Olsen PF, Fukushim.T (1973) Tularemia epidemic associated with deer fly. *Journal of the American Medical Association* 226: 149-152.
33. Petersen JM, Mead PS, Schriefer ME (2009) *Francisella tularensis*: an arthropod-borne pathogen. *Veterinary Research* 40.
34. Kolonin GV (1969) [Significance of blood-sucking Diptera in epizootiology and epidemiology of anthrax (review of literature)]. *Med Parazitol* 38: 354-357.
35. Morris H (1918) Blood-sucking insects as transmitters of anthrax or charbon. Baton Rouge: La: Agricultural Experiment Station of Louisiana State University and A. & M. College.
36. Mitzmain (1914) Experimental insect transmission of anthrax. *Public Health Reports* 29: 75-77.
37. Magnarelli LA, Anderson JF, Barbour AG (1986) The etiologic agent of Lyme disease in deer flies, horse flies and mosquitoes. *Journal of Infectious Diseases* 154: 355-358.
38. Amanzhulov SA, Amosenkova NI, Postricheva OV (1965) Finding of *Rickettsia burneti* in horseflies *Tabanus staegeri*. *Medskaya Parazit* 34: 612-614.
39. Nieschulz O, Huber FL (1928) [Over enkele bouwturen parabout-vuoverbrengingsproeven met Tabaniden]. *Veeartsenijkundige Mededeeling* 67.
40. Nieschulz O, Kraneveld FC (1929) [Experimentelle Untersuchungen über die Uebertragung der Büffelseuche durch Insekten]. *Zentbl Bakteriol Parasitenk I Orig* 113: 403-417.
41. Wellmann G (1951) Blood sucking insects as mechanical vectors of Brucella. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene I Abt Medizinisch-hygienische Bakteriologie, Virusforschung und Parasitologie Originale* 156: 414-426.
42. Alekseev AN, Chirov PA, Kadyshcheva MA, F. SV (1969) Survival, multiplication and discharge into the environment of the pathogens of listeriosis and uniteric leptospirosis by horse flies in experimental conditions. *Meditsinskaia parazitologiya i parazitarnye bolezni* 38: 583-588.
43. Dem'yachenko GF, Baranenkova MA (1970) Transmission of the causative agent of listeriosis through bites of horse flies (Tabanidae) bites. *Meditsinskaia parazitologiya i parazitarnye bolezni* 39: 573-577.
44. Wellmann G (1950) Blood-sucking arthropods as the vectors of zootic disease. *Berliner tierärztliche Wochenschrift* 8: 155-160.
45. Levine JF, Levy MG, Nicholson WL, Irby WS, Gager R, et al. (1992) Attempted mechanical transfer of *Ehrlichia risticii* by tabanids (Diptera, Tabanidae). *Journal of Medical Entomology* 29: 806-812.
46. Bigalke RD (1968) New concepts on the epidemiological features of bovine besnoitiosis as determined by laboratory and field investigations. *The Onderstepoort journal of veterinary research* 35: 3-137.
47. Collier WA (1928) [Die derengadera und ihre Bekämpfung]. *Deut Oesterr Tierärztl Wochenschr* 36: 749-752.
48. Gruvel J, Balis J (1965) Trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in dromedaries in Chad and its principal vectors. *Revue d'elevage et de medecine veterinaire des pays tropicaux* 18: 435-439.
49. Mitzmain MB (1913) The mechanical transmission of surra by *Tabanus striatus* Fabr. *Philippine Journal of Science* 8: 223-229.
50. Mohler JR, Thompson W (1911) A study of surra found in an importation of cattle, followed by prompt eradication. Washington: United States Dept. of Agriculture, Bureau of Animal Industry.
51. Nieschulz O (1925) [Zoologische bijdragen tot het Surraprobleem. I. Experimenteele overbrenging van *Tryp. evansi* door *Tabanus stantoni* Ricardo en *T. ceylonicus* Schiner]. *Veeartsenijkundige mededeelingen* 53.
52. Nieschulz O (1926) [Overbrengingsproeven met *Tabanus rubidus*, Wied., *T.striatus*, Fabr., en *Stomoxys calcitrans* L.]. *Veeartsenijkundige mededeelingen* 55.
53. Nieschulz O (1927) [Overbrengingsproeven met *Haematopota cingulata* Wied.]. *Ned-Ind Blad Diergeneesk* 38.
54. Nieschulz O (1927) [Zoologische bijdragen tot het Surraprobleem. XI. Enkele proeven met *Haematopota truncata* Schuum. Stekh., *H. irrorata* Macq. en *Tabanus brumipes* Sch. Steckh.]. *Veeartsenijkundige Mededeeling* 61.

55. Nieschulz O, Ponto SAS (1927) [Zoologische bijdragen tot het Surraprobleem. XV. Enkele overbrengingsproeven met *Chrysops flaviventris* Macq. en *C. dispar* Fabr.]. Veeartsenijkundige mededeelingen 62.
56. Singh K (1926) Surra transmission experiments. Dep. Agr. Punjab. Vet. Bull.
57. Yutuc LM (1949) Observations on the prevalence of tabanid flies and surra-transmission experiments. Philippine Journal of Science 78: 379-387.
58. Sergent E, Sergent E (1905) [Trypanosomiase des dromadaires de l'Afrique du nord]. Annales de l'Institut Pasteur 19: 17-18.
59. Desquesnes M, Dia ML (2003) *Trypanosoma vivax*: mechanical transmission in cattle by one of the most common African tabanids, *Atylotus agrestis*. Experimental Parasitology 103: 35-43.
60. Desquesnes M, Dia ML (2004) Mechanical transmission of *Trypanosoma vivax* in cattle by the African tabanid *Atylotus fuscipes*. Veterinary Parasitology 119: 9-19.
61. Parra-Henao G, Alarcon-Pineda EP, Lopez-Valencia G (2008) Ecology and parasitological analysis of horse flies (Diptera: Tabanidae) in Antioquia, Colombia. Caldasia 30: 179-188.
62. Raymond HL (1990) *Tabanus importunus*, experimental mechanical vector of *Trypanosoma vivax* in French Guiana. Annales De Parasitologie Humaine Et Comparee 65: 44-46.
63. Ferenc SA, Raymond HL, Lancelot R. [Essai de transmission mécanique de *Trypanosoma vivax* Ziemann (Kinetoplastida: Trypanosomidae) par le taon neotropical *Cryptotylus unicolor* (Wiedmann) (Diptera: Tabanidae); 1990.
64. Otte MJ, Abuabara JY (1991) Transmission of South-American *Trypanosoma vivax* by the neotropical horsefly *Tabanus nebulosus*. Acta Tropica 49: 73-76.
65. Bose R, Friedhoff KT, Olbrich S, Buscher G, Domeyer I (1987) Transmission of *Trypanosoma theileri* to cattle by Tabanidae. Parasitology Research 73: 421-424.
66. Kraneveld FC (1931) [Enkele Overbruggingsproeven van *Trypanosoma Theileri* Laveran 1902 met Tabaniden]. Ned-Ind Blad Diergeneesk 43: 132-192.
67. Nöller W (1916) [Die Übertragung des *Trypanosoma theileri* Laveran 1902]. Berlin Tierärztl Wochenschr 39: 457-460.
68. Nöller W (1925) [Der Nachweis des Übertragers des gemeinen Rindertrypanosomas, *Trypanosoma theileri*, mit Hilfe des Kulturverfahrens]. Zentbl Bakteriol Parasitenk I Orig 79: 133-142.
69. Packchianian A (1957) The isolation and cultivation of hemoflagellates in pure culture from six species of insects. Texas reports on biology and medicine 15: 399-410.
70. Davies RB, Clark GG (1974) Trypanosomes from elk and horse flies in New Mexico. Journal of wildlife diseases 10: 63-65.
71. Dirie MF, Bornstein S, Wallbanks KR, Stiles JK, Molyneux DH (1990) Zymogram and life-history studies on trypanosomes of the subgenus *Megatrypanum*. Parasitology Research 76: 669-674.
72. Sergent E, Sergent E (1906) [Etudes sur les trypanosomiasés de Berbérie en 1905]. Annales de l'Institut Pasteur 20: 665-681.
73. Duke FL, Mettam RWM, Wallace JM (1934) Observations on the direct passage from vertebrate to vertebrate of recently isolated strains of *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma rhodiense* Trans Roy Soc Trop Med Hyg 28: 77-81.
74. DeGiusti DL, Sterling CR, Dobrzecz D (1973) Transmission of chelonian haemoproteid *Haemoproteus metchnikovi* by a tabanid fly *Chrysops callidus*. Nature 242: 50-51.
75. Leiper RT (1913) "Calabar swellings". Lancet 1: 31.
76. Kleine FK (1915) [Die Übertragung von Filarien durch *Chrysops*]. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten 80: 345-349.
77. Connal A, Connal SLM (1922) The development of *Loa loa* in *Chrysops*. British Medical Journal 1922: 730-731.
78. Williams P (1960) Studies on Ethiopian *Chrysops* as possible vectors of loiasis. II. *Chrysops silacea* Austen and human loiasis. Annals of tropical medicine and parasitology 54: 439-459.
79. Orihel TC, Lowrie RC (1975) *Loa loa*: development to infective stage in an american deerfly, *Chrysops atlanticus*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 24: 610-615.
80. Gordon RM, Crewe W (1953) The deposition of the infective stage of *Loa loa* by *Chrysops silacea* and the early stage of its migration to the deeper tissues of the mammalian host. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 47: 74-85.
81. Lavoipierre MMJ (1958) Studies on the host-parasite relationships of filarial nematodes and their arthropod hosts. I. The sites of development and the migration of *Loa loa* in *Chrysops silacea*, the escape of the infective forms from the head of the fly, and the effect of the worm on its insect host. Ann Trop Med Parasitol 52: 103-121.
82. Duke BOL (1972) Behavioural aspects of the life cycle of *Loa* In: Canning EU, Wright CA, editors. Behavioural aspects of parasite transmission. New-York: Academic Press.
83. Noireau F, Nzoulani A, Sinda D, Itoua A (1990) *Chrysops silacea* and *C. dimidiata* fly densities and infection rates with *Loa loa* in the Chaillu mountains, Congo Republic. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 84: 153-155.
84. Clark GG, Hibler CP (1973) Horse flies and *Elaeophora schneideri* in the Gila National Forest, New Mexico. Journal of wildlife diseases 9: 21-25.
85. Hibler CP, Gates GH, White R, Donaldson BR (1971) Observations on horseflies infected with larvae of *Elaeophora schneideri*. Journal of wildlife diseases 7: 43-45.
86. Weinmann CJ, Anderson JR, Longhurst WM, Connolly G (1973) Filarial worms of Columbian black-tailed deer in California. 1. Observations in the vertebrate host. Journal of wildlife diseases 9: 213-220.
87. Couvillion CE, Nettles VF, Sheppard DC, Joyner RL, Bannaga OM (1986) Temporal occurrence of 3rd stage larvae of *Elaeophora schneideri* in *Tabanus lineola* Hinellus on South island, South-Carolina. Journal of Wildlife Diseases 22: 196-200.
88. Coluzzi M (1964) [Osservazioni sperimentali sul comportamento di *Dirofilaria repens* in diversi gruppi di artropodi ematofagi]. Parasitologia 6: 57.
89. Spratt DM (1974) Distribution of third-stage *Dirofilaria roemeri* (Nematoda: Filarioidea) in the tissues of Tabanidae (Diptera). International Journal for Parasitology 4: 477-480.

**Annexe 3. Clé d'identification des Tabanidae de France (d'après
Chvála *et al.* 1972)**

Tabanidae de France

Clé des genres et des espèces d'après Chvála *et al.* (1972)

Sous-familles et genres

- 1 Présence d'épines apicales sur les tibias postérieurs ; vertex habituellement avec des ocelles fonctionnelles sur un tubercule 2
- Absence d'épines sur les tibias postérieurs ; absence d'ocelles fonctionnelles, vertex avec au plus une bosse ocellaire 5

- 2 Flagellum de l'antenne composé de 7 à 8 segments, segment basal du flagellum (=segment 3) mal différencié des segments suivants ; labelles très petits et étroits, proboscis remarquablement long, plus long que la hauteur de la tête (sous-famille des Pangoniinae) *Pangonius*
- Flagellum composé de seulement 5 segments, les 4 derniers segments étant nettement plus courts et plus étroits que le segment basal ; labelles plutôt larges et enflés, occupant 1/3 de la longueur du proboscis, proboscis beaucoup plus court (sous-famille des Chrysopsinae) 3

- 3 Segments 1 et 2 de l'antenne longs et fins, environ de longueurs égales ; face avec des calli faciaux et genoux distincts, ou au moins des calli faciaux légèrement développés ; ailes avec des motifs marron *Chrysops*
- Segment 2 de l'antenne nettement plus court que le segment 1 ; face sans calli ; ailes claires 4

- 4 Segment 1 de l'antenne long et fin, segment 2 raccourci mais environ 2 fois aussi long que large ; espèce essentiellement grise ; présence d'un point central ou d'une bande isolée sur les yeux (quand relâchés) *Nemorius vitripennis*
- Segment 1 de l'antenne court et gros, segment 2 très court, aussi long que large ; espèces essentiellement jaunes ou jaune-marron avec des yeux tachetés (quand relâchés) *Silvius*

- 5 Flagellum de l'antenne composé de 5 segments, le segment 3 étant une fusion de 4 segments flagellaires et possédant une dent dorsale plus ou moins développée, parfois fortement recourbée 6
- Flagellum de l'antenne composé de 4 segments, le segment 3 étant une fusion de 5 segments flagellaires et ne possédant pas de dent dorsale (à l'exception de *Glaucops*) 11

- 6 Basicosta nu ; espèces plutôt robustes avec un abdomen large et aplati ; tubercule ocellaire absent 7
- Basicosta avec des soies ; espèces de taille variable avec un abdomen plutôt allongé (à l'exception de *Theriopectes*) ; tubercule ocellaire parfois développé 8

- 7 Yeux nus ; chez la femelle, calli frontaux joints en forme de quille ; ailes toujours claires ; espèces avec un abdomen jaune-marron à marron-noir *Philipomyia*
- Yeux souvent pubescents à l'échelle microscopique ; calli frontaux bien développés ; espèces essentiellement noires avec les ailes plus ou moins fumées *Dasyrhamphus*

- 8 Yeux jaune clair à gris-vert pâle chez les individus frais, avec habituellement une bande incomplète étroite ou non bandés ; yeux clair à rouge-marron chez les individus secs ; chez la femelle, calli frontaux réduits, très petits voire absents ; espèces généralement petites, gris clair à jaune-marron *Atylotus*
- Yeux vert brillant à rouge-marron foncé chez les individus frais, avec 1 à 4 bandes ou non bandés ; yeux noirs chez les individus secs ; chez la femelle, calli frontaux bien développés ; espèces foncées ou claires, de taille variable 9

- 9 Tibias postérieurs très gros et avec de très nombreuses soies blanches ; yeux pubescents, non bandés ; espèce grande, noire avec des couleurs vives *Theriopectes gigas*
 - Tibias postérieurs fins et jamais avec autant de soies blanches ; espèces petites à grandes, habituellement uniformément noires, grises ou rouge-marron, rarement avec des couleurs vives 10
- 10 Souvent présence d'un tubercule ocellaire bien développé et brillant ; yeux plus ou moins pubescents, avec habituellement 3 bandes ; espèces essentiellement noires, souvent avec des marques latérales rouge-marron très nettes sur les tergites antérieurs *Hybomitra*
 - Absence de tubercule ocellaire, yeux nus (à l'exception du groupe *quatuornotatus*) avec 1 à 4 bandes ou non bandés ; espèces grises à marron, de taille variable (voir aussi *Glaucops*) *Tabanus*
- 11 Ailes avec des motifs gris-marron très distincts composés de petits points et de rosettes... *Haematopota*
 - Ailes claires, sans aucun motif 12
- 12 Antennes très longues et très fines, 2 fois plus longues que la profondeur de la tête ; flagellum avec le segment basal mal différencié des 3 derniers segments ; antennes apparemment séparées en 6 segments *Heptatoma pellucens*
 - Antennes courtes comme les Tabaninae, partie basale du premier segment avec une dent dorsale distincte ; derniers segments flagellaires courts, gros et indistinctement séparés *Glaucops hirsutus*

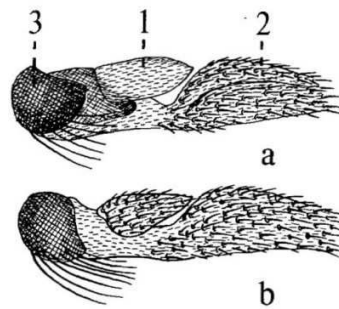


Fig. 3. Base of wing in: a. *Limata capensis* (Tribe Diachlorini) and b. *Tabanus taeniola* (Tribe Tabanini), 1 = basicosta, 2 = costa, 3 = tegula. (Redrawn after Oldroyd, 1954).

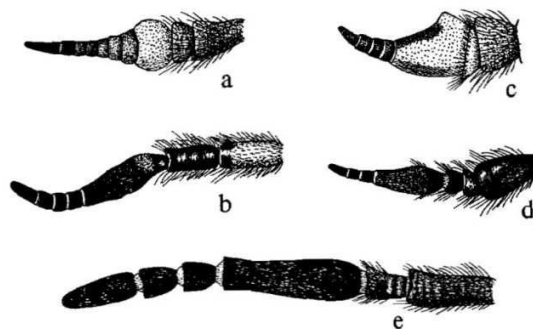


Fig. 2. Antennae of Tabanidae, a. *Pangonius micans* Meig., b. *Chrysops viduatus* (F.), c. *Hybomitra distinguenda* (Verr.), d. *Haematopota pluvialis* (L.), e. *Heptatoma pellucens* (F.).

Pangoniinae

Pangoniini

Pangonius

- 1 Flagellum élargi à la base, les 2 segments basaux courts, moins longs que larges et nettement plus larges que les segments suivants ; espèces généralement noires, avec seulement des marques latérales marron sur les premiers segments abdominaux (sous-genre *Melanopangonius*) 2
- Flagellum moins élargi à la base, les 2 segments basaux au-moins aussi longs que larges et non différenciés des segments suivants ; espèces habituellement avec un abdomen plus ou moins marron, ou noir avec des soies claires densément réparties (sous-genre *Pangonius*) 4

- 2 (1) Abdomen entièrement noir brillant sans tache latérales marron ; espèces généralement grandes, 15-21mm 3
- Abdomen noir brillant, 3 premiers tergites avec des petites taches latérales marron-rouge ; ailes légèrement et uniformément fumées ; espèces généralement plus petites 15,5-16mm *griseipennis*

- 3 (2) Ailes fumées jaune-marron ou presque claire avec des veines marron, calypters jaune clair ; antennes surtout marron-rouge ; partie inférieure de la tête, thorax et une partie de l'abdomen couverts de soies gris claire; fémurs marron chez la femelle *micans*
- Ailes fumées marron foncé avec des veines marron foncé ; antennes noires, au plus segment 3 légèrement marron à la base ; fémurs noirs dans les 2 sexes *haustellatus*

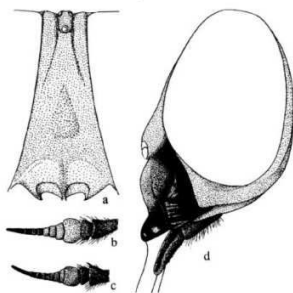


Fig. 7. *Pangonius (Melanopangonius) micans* Mielg., a. female frons, b. female antenna, c. male antenna, d. female head in lateral view.

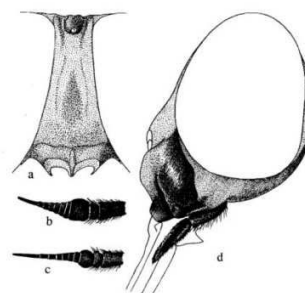


Fig. 8. *Pangonius (Melanopangonius) haustellatus* (P.), a. female frons, b. female antenna, c. male antenna, d. female head in lateral view.

- 4 (1) Face entièrement brillante, noire ou marron foncé, sans aucune trace de duvet gris (groupe *pyritosus*) *obscuratus*
- Face plus ou moins couverte d'un duvet gris, au moins sur le tiers ou le quart basal (groupe *mauritanus*) *mauritanus*

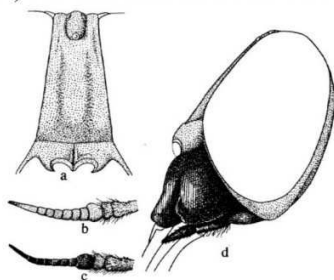


Fig. 11. *Pangonius (P.) fulvipes* Lw., a. female frons, b. female antenna, c. male antenna, d. female head in lateral view.

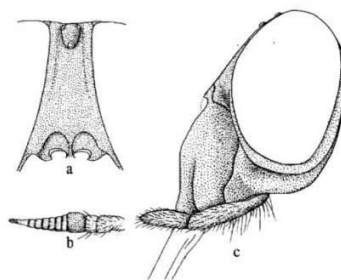


Fig. 13. *Pangonius (P.) mauritanus* (L.), female, a. frons, b. antenna, c. head in lateral view.

Chrysopsinae

Chrysopsini

Chrysops

- 1 Pattes, y compris les tibias, entièrement noires (groupe *sepulcralis*)..... 2
- Pattes avec au moins les tibias postérieurs marron 4
- 2 (1) Face et front uniformément noir brillant, abdomen essentiellement noir *sepulcralis*
- Face et front jaunes ou gris avec des calli nettement brillant 3

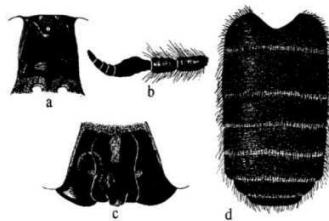


Fig. 23. *Chrysops (C.) sepulcralis* (F.), female. a, front; b, antenna; c, face; d, abdomen.

- 3 (2) Aile avec une tache apicale très étroite, atteignant à peine la veine R4 ; tergite 2 avec un motif noir en forme de « V » inversé très ouvert, non relié au tergite 3, tergites suivants avec des bords jaunes nets sur les marges postérieurs *divaricatus*
- Aile avec une grande tache apicale, occupant presque les 3/4 de la veine R4 ; tergite 2 avec un motif noir en forme de « V » inversé, relié au tergite 3 en dessous, tergites suivants surtout noirs sans bordures pales *caecutiens*

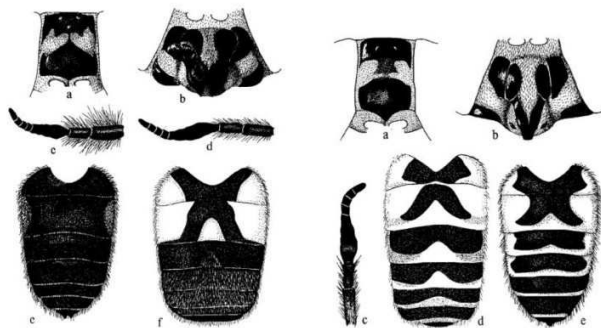


Fig. 24. *Chrysops (C.) caecutiens* (L.), a, female front; b, female face; c, male antenna; d, female antenna; e, male abdomen; f, female abdomen.

Fig. 25. *Chrysops (C.) divaricatus* Lw., a, female front; b, female face; c, female antenna; d, female abdomen; e, male abdomen.

- 4 (1) Cellule discale fumée, au plus zone centrale hyaline mais peu nette 5
- Cellule discale avec zone centrale claire (groupe *italicus*) 8

- 5 (4) Tergite 2 jaune avec une ou deux taches noires au milieu ; cellule anale fermée, ailes claires avec des motifs marron nets (groupe *relictus*) 6
- Tergite 2 avec les cotés sombres et un triangle médian gris ; ailes teintées de marron avec des motifs marron peu nets (groupe *rufipes*) *rufipes*

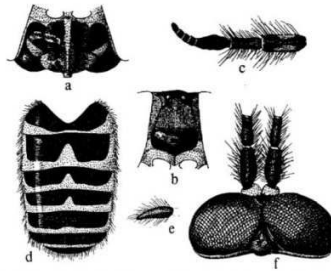


Fig. 32. *Chrysopa (C.) rufipes* Meig., a. female face, b. female frons, c. female antenna, d. female abdomen, e. male palpus, f. male head from above.

- 6 (5) Tergite 2 avec une petite tache noire, carré ou ovale, au milieu près de la marge antérieure ; aile avec une grande tache apicale , occupant les 3/4 de la veine R4 *viduatus*
- Tergite 2 avec deux grandes taches noires, habituellement de forme triangulaire 7

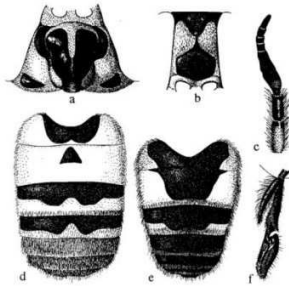


Fig. 37. *Chrysopa (C.) viduata* (F.), a. female face, b. female frons, c. female antenna, d. female abdomen, e. male abdomen, f. male proboscis and palpus.

- 7 (6) Tergite 2 avec deux taches noires reliées antérieurement et touchant la marge antérieure ; aile avec une grande tache apicale occupant presque toute la veine R4..... *relictus*
- Tergite 2 avec deux taches noires très séparées, ne touchant pas la marge antérieure ; aile avec une tache apicale moins grande, occupant au plus la moitié de la veine R4 *parallelogrammus*

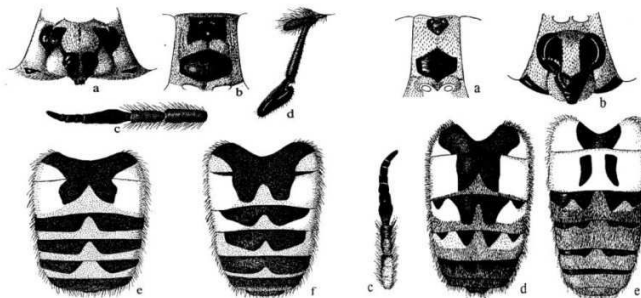


Fig. 28. *Chrysopa (C.) relictus* Meig., a. female face, b. female frons, c. female antenna, d. male proboscis and palpus, e. female abdomen, f. male abdomen. Fig. 30. *Chrysopa (C.) parallelogrammus* Zell, a. female frons, b. female face, c. female antenna, d. male abdomen, e. female abdomen.

- 8 (4) Grands calli faciaux, largement reliés au callus rostral et grands calli géniaux 9
 - Petits calli faciaux, séparés des marges oculaires et seulement reliés de façon peu nette au callus rostral, si présent ; habituellement, pas de calli géniaux *connexus*

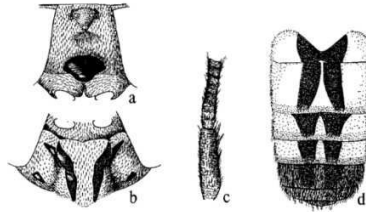


Fig. 36. *Chrysops (C.) connexus* Lw., female. a. frons, b. face, c. antenna, d. abdomen.

- 9 (8) Aile avec une petite tache apicale occupant 1/3 à 1/2 de la veine R4 ; tergite 2 avec deux petites taches noires plutôt perpendiculaires ; espèces petites, 6-9mm *flavipes*
 - Aile avec une grande tache occupant les 3/4 de la veine R4 ; tergite 2 avec deux grandes taches noires, plutôt obliques, dirigées vers les coins postérieurs du tergite ; espèces grandes 8,5-10mm

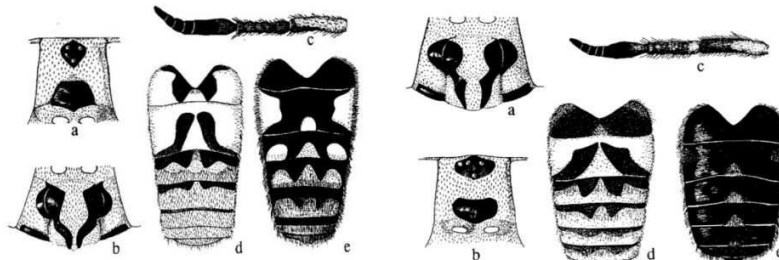


Fig. 34. *Chrysops (C.) flavipes* Meig., a. female frons, b. female face, c. female antenna, d. female abdomen, e. male abdomen.

Fig. 35. *Chrysops (C.) italicus* Meig., a. female face, b. female frons, c. female antenna, d. female abdomen, e. male abdomen.

Nemorius

Nemorius vitripennis

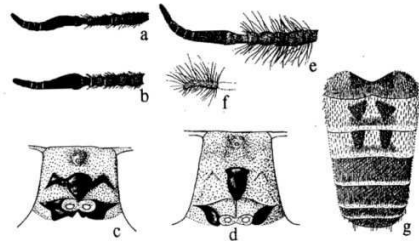


Fig. 48. *Nemorius* Rond., a. female antenna of *vitripennis* (Meig.), b. female antenna of *caucasicus* (Ols.), c. female frons of *vitripennis* (Meig.), d. female frons of *caucasicus* (Ols.), e. male antenna of *vitripennis* (Meig.), f. male palpus of same, g. female abdomen of same.

Silvius

- Abdomen couvert dorsalement de soies courtes et foncées lui conférant un aspect marron et formant distinctement des triangles médians jaunes ; antennes longues, segments terminaux du flagellum au moins aussi longs que le segment 3 ; male avec une rangée de longues soies noires densément fixées sur le vertex *algerius*
- Abdomen unicolore jaune-marron ; antennes courtes, segments terminaux du flagellum plus courts que le segment 3 ; male avec une rangée de courtes soies claires à foncées sur le vertex *alpinus*

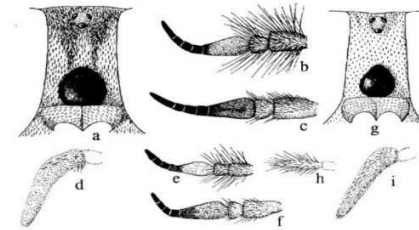


Fig. 59. a-d. *Silvius algerius* Meig. and e-i. *Silvius alpinus* (Scop.) a. female frons, b. male antenna, c. female antenna, d. female palpus, e. male antenna, f. female antenna, g. female frons, h. male palpus, i. female palpus.

Tabaninae

Tabanini

***Atylotus* (femelles)**

- 1 Yeux distinctement pubescent même si les soies sont courtes 2
- Yeux nus, quelques soies minuscules peuvent être observées 5

- 2 (1) Petite espèce grisâtre, au plus 11mm de long 3
- Espèce plus grande, environ 14 mm de long 4

- 3 (2) Front large (1 : 2,5), vertex avec une rangée de longues soies noires ; palpes épais, 2,5 fois plus longs que larges *sublunaticornis*
- Front plus étroit (1 : 3-3,5), vertex avec seulement des petites soies noires ; palpes plus fins, 3 fois plus longs que larges *plebejus*

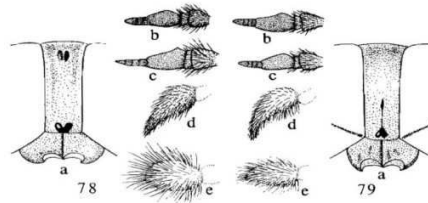


Fig. 78. *Atylotus sublunaticornis* (Zett.), a. female frons, b. female antenna, c. male antenna, d. female palpus, e. male palpus.
 Fig. 79. *Atylotus plebejus* (Fall.), a. female frons, b. female antenna, c. male antenna, d. female palpus, e. male palpus.

- 4 (2) Vertex avec des petites soies claires ; segments basaux des antennes avec des poils noirs *latistriatus*
- Vertex avec une rangée de longues soies claires *agricola*

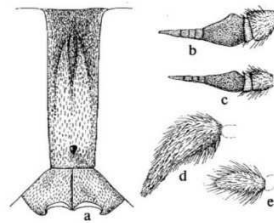


Fig. 80. *Atylotus latistriatus* (Brauer), a. female frons, b. female antenna, c. male antenna, d. female palpus, e. male palpus.

- 5 (1) Vertex avec seulement des petites soies claires 5
- Vertex avec une rangée distincte de longues soies claires ; abdomen avec une large bande noire médiane et dorsale *flavoguttatus*

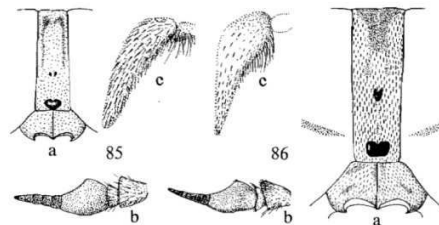


Fig. 85. *Atylotus pallitarsis* (Ols.), female, a. frons, b. antenna, c. palpus.
 Fig. 86. *Atylotus flavoguttatus* (Szil.), female, a. frons, b. antenna, c. palpus.

- 6 (5) Espèce jaunâtre à jaune-marron avec des soies dorées à jaune-marron 7
 - Espèce grise avec des soies grises à argentées 8
- 7 (6) Espèce marron-jaune à marron clair ; calli frontaux très petits, parfois peu visibles ; troisième segment des antennes aussi long que large *fulvus*
 - Espèce surtout jaune-dorée avec des calli frontaux bien développés ; troisième segment des antennes 1,5 fois plus long que large *loewianus*

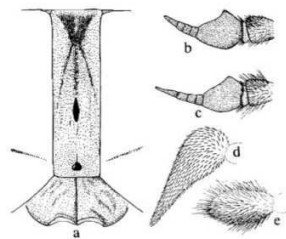


Fig. 81. *Atylotus fulvus* (Meig.), a. female frons, b. female antenna, c. male antenna, d. female palpus, e. male palpus.

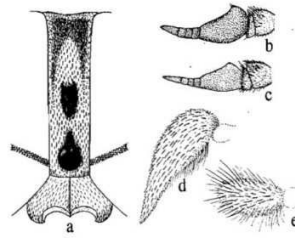


Fig. 82. *Atylotus loewianus* (Vill.), a. female frons, b. female antenna, c. male antenna, d. female palpus, e. male palpus.

- 8 (6) Fémurs entièrement gris foncé avec seulement les apex jaunâtres ; front large (1:3,5-4) *rusticus*
 - Fémurs jaunâtres à jaune-marron, parfois grisâtres à la base ; front étroit (1:4-5) *quadrifarius*

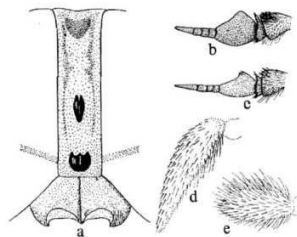


Fig. 83. *Atylotus rusticus* (L.), a. female frons, b. female antenna, c. male antenna, d. female palpus, e. male palpus.

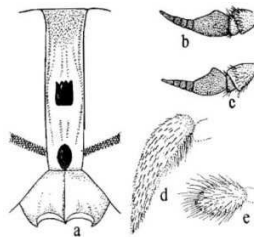


Fig. 84. *Atylotus quadrifarius* (Lw.), a. female frons, b. female antenna, c. male antenna, d. female palpus, e. male palpus.

Glaucops

Glaucops hirsutus

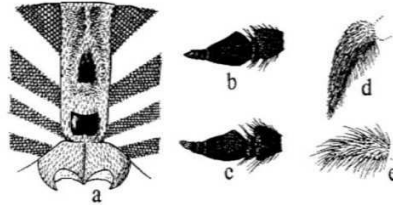


Fig. 135. *Glaucops hirsutus* (Villers), a. female frons, b. female antenna, c. male antenna, d. female palpus, e. male palpus.

Hybomitra (femelles)

- 1 Pattes noires unicolores ; espèces moyennes noires (groupe *aterrima*) 2
- Pattes bicolores avec au moins les tibias postérieurs marrons ; espèces marron-rouge ou gris-noir 5

- 2 (1) Subcallus noir brillant ; antennes et palpes foncés ; abdomen noir avec des motifs gris mal définis, tergite 2 largement gris sur les côtés *micans*
- Subcallus poudré d'un gris terne ; abdomen avec des soies pales sur les marges postérieures de tous les tergites ou entièrement noir sans taches grises sublérales 3

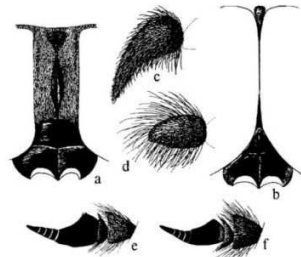


Fig. 46. *Hybomitra micans* (Meig.), a. female frons, b. male frons, c. female palpus, d. male palpus, e. female antenna, f. male antenna.

- 3 (2) Tergites avec des soies jaunes dorées plus ou moins nettes sur les marges postérieures *auripila*
- Tergites entièrement sombres avec des soies de la même couleur, ou avec des soies grises peu nettes sur le milieu ou sur les côtés des marges postérieures 4

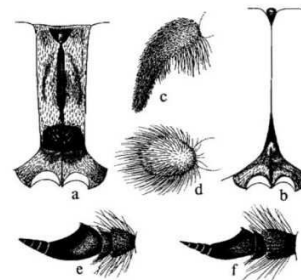


Fig. 47. *Hybomitra auripila* (Meig.), a. female frons, b. male frons, c. female palpus, d. male palpus, e. female antenna, f. male antenna.

- 4 (3) Palpes foncés de largeur constante avec des soies noires ; face avec des soies noires, bases des antennes hautes ; présence d'une tache foncée distincte à la base de la veine R4 *aterrima*
 - Palpes jaune-marron plutôt épais à la base avec des soies pales ; face avec essentiellement des soies pales ; bases des antennes étroites ; absence de tache foncée à la base de la veine R4 *caucasica*

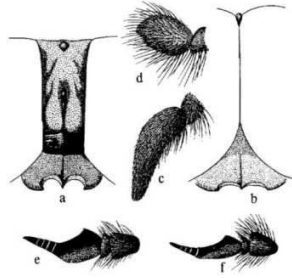


Fig. 48. *Hybomitra aterrima* (Meig.), a. female frons, b. male frons, c. female palpus, d. male palpus, e. female antenna, f. male antenna.

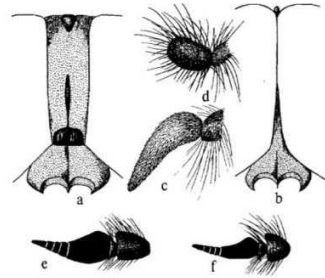


Fig. 49. *Hybomitra caucasica* (End.), a. female frons, b. male frons, c. female palpus, d. male palpus, e. female antenna, f. male antenna.

- 5 (1) Front très large (1:1,5-2) ; abdomen très large et aplati, gris clair, avec trois bandes marron longitudinales (groupe *vittata*) *vittata*
 - Front souvent plus étroit (au plus 1:2,5) et motifs abdominaux différents ; abdomen de la même forme que les Tabaninae, jamais aplati 6

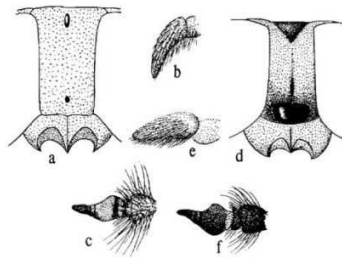


Fig. 57. a-c. *Hybomitra vittata* (F.) and d-f. *H. macularis* (F.), a and d. female frons, b and e. female palpus, c and f. female antenna.

- 6 (5) Haltères marron à marron foncé, légèrement pale au bout ; yeux plus ou moins pubescent ; espèce marron-rouge ou gris foncé 7
 - Haltères jaune-blanche ; yeux nus ou avec seulement quelques soies minuscules ; si les sont yeux très pubescents, l'abdomen est pointu au bout ; espèce marron-rouge ; tubercule ocellaire vestigial ; antennes très noires 19

- 7 (6) Palpes avec les segments apicaux longs et fins, longueur plus de 4 fois égale à la largeur, marrons foncés ; front large *kaurii*
 - Palpes avec les segments apicaux plus épais à la base, longueur au plus égale à 3 fois la largeur, toujours blanc-jaune à marron clair ; front large ou étroit 8

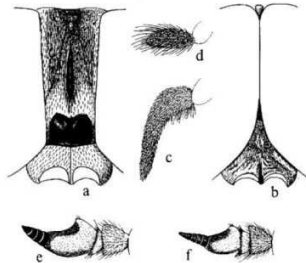


Fig. 55. *Hybomitra kaurii* Chv. & Lynch, a. female frons, b. male frons, c. female palpus, d. male palpus, e. female antenna, f. male antenna.

- 8 (7) Front large (1:2,5-4) avec les bords parallèles ; grand callus inférieur poli (groupe *montana*) 9
 - Front étroit (1:4-6) souvent plus large au dessus ; petit callus inférieur, nettement ridé (groupe *bimaculata*) 14
- 9 (8) Abdomen entièrement gris-noir dorsalement, sans marques latérales marron-rouge 10
 - Abdomen largement marron-rouge sur les côtés, marques latérales marrons au moins sur le tergite 2 11
- 10 (9) Front très large (1:2,5), callus inférieur très large ; abdomen avec des motifs gris clair distincts, tergite 2 largement gris sur les côtés *pilosa*
 - Front plus étroit ; abdomen avec des motifs gris peu distincts, taches sublatales ovales sur tous les tergites de taille égale *montana* var. *flaviceps*

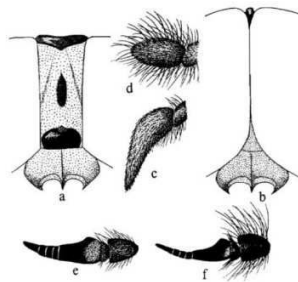


Fig. 57. *Hybomitra pilosa* (Lw.), a. female frons, b. male frons, c. female palpus, d. male palpus, e. female antenna, f. male antenna.

- 11 (9) Subcallus poli, marron à noir, au moins sur la moitié ou sur la partie supérieure *lurida*
 - Subcallus entièrement terni et poudré de gris 12
- 12 (11) Segment 3 de l'antenne large, surtout marron-rouge ; lobes notopleuraux noirs *lundbecki*
 - Segment 3 de l'antenne plutôt élancé et plus ou moins foncé ; lobes notopleuraux marron 13

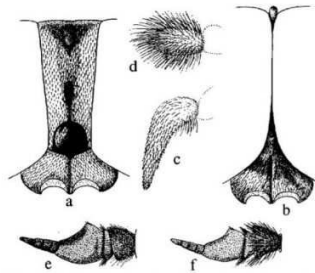


Fig. 62. *Hybomitra lundbecki* Lynch, a. female frons, b. male frons, c. female palpus, d. male palpus, e. female antenna, f. male antenna.

- 13 (12) Segment 3 de l'antenne plutôt élargi, marron à la base ; côtés du thorax et abdomen avec de nombreuses soies jaunes dorées ; espèce généralement grande 15,5-18mm *tropica*
- Segment 3 de l'antenne remarquablement élargi, souvent légèrement marron à la base ; côtés du thorax et abdomen avec des soies grises et noires ; espèce généralement plus petite 12,5-16mm *montana*

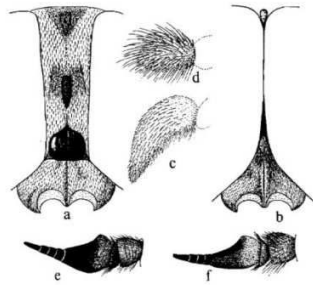


Fig. 63. *Hybomitra tropica* (L.), a. female frons, b. male frons, c. female palpus, d. male palpus, e. female antenna, f. male antenna.

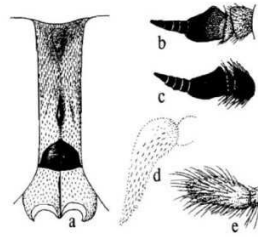


Fig. 64. *Hybomitra montana* (Mcig.), a. female frons, b. female antenna, c. male antenna, d. female palpus, e. male palpus.

- 14 (8) Abdomen unicolore gris-noir dorsalement avec des motifs gris, au plus des traces de coloration marron sur les côtés des 2 premiers tergites *bimaculata* var. *bisignata*
- Abdomen avec des marques latérales au moins sur les 2 premiers tergites 15
- 15 (14) Marques latérales marron-rouge sur les 3 premiers tergites au plus, ou si marque aussi sur le tergite 4, alors les segments basaux des antennes sont nettement poudré de gris 16
- Marques latérales marron-rouge sur les 4 premiers tergites, ou si seulement sur les 3 premiers alors segments basaux des antennes et lobes notopleuraux marron clair 18
- 16 (15) Lobes notopleuraux marron ; abdomen avec une bande dorsale médiane sombre étroite, occupant au plus 1/3 des tergites ; cerques nettement plus longs que larges, plaque subgénitale très étroite avec une excision profonde au-dessus *muehlfeldi*
- Lobes notopleuraux noirs ; cerques courts et larges ; plaque subgénitale large, arrondi à l'apex 17

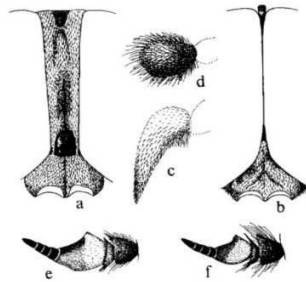


Fig. 66. *Hybomitra muehlfeldi* (Braun), a. female frons, b. male frons, c. female palpus, d. male palpus, e. female antenna, f. male antenna.

- 17 (16) Segments basaux de l'antenne gris-noir ; abdomen avec une bande dorsale médiane large, occupant plus d'1/3 des tergites, marques latérales jaune-marron foncé à peine séparé de la bande médiane ; pleures surtout gris foncé avec des soies noires *bimaculata*
- Segments basaux de l'antenne claires, toujours poudré de gris (mais la couleur de fond marron est visible) ; abdomen avec une bande médiane étroite, occupant moins d'1/3 des tergites, marques latérales jaune-marron clair (souvent blanches) et séparées nettement de la bande médiane ; pleures avec des soies gris clair *solstitialis*

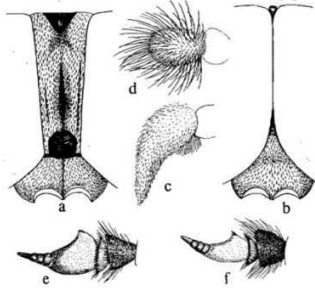


Fig. 67. *Hybomitra bimaculata* (Macq.), a. female frons, b. male frons, c. female palpus, d. male palpus, e. female antenna, f. male antenna.

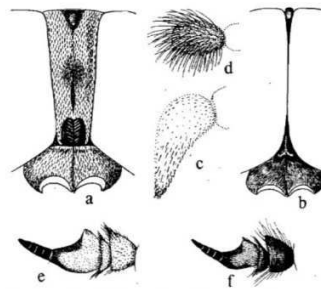


Fig. 68. *Hybomitra solstitialis* (Meig.), a. female frons, b. male frons, c. female palpus, d. male palpus, e. female antenna, f. male antenna.

- 18 (15) Segment basaux de l'antenne et lobes notopleuraux jaune-marron ; callus inférieur souvent marron ; tergite 2 avec des soies pales et foncées sur les côtés *ciureai*
- Segments basaux de l'antenne gris-noir et lobes notopleuraux marron foncé à noir ; callus inférieur noir ; tergite 2 avec des soies unicolores jaunes dorées sur les côtés et sans soies noires *distinguenda*

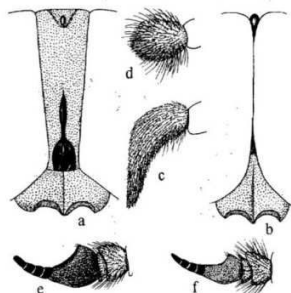


Fig. 70. *Hybomitra ciureai* (Ség.), a. female frons, b. male frons, c. female palpus, d. male palpus, e. female antenna, f. male antenna.

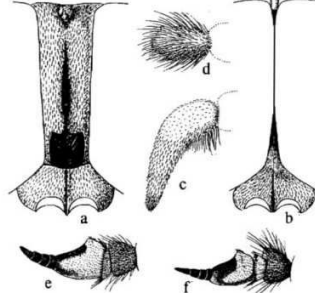


Fig. 69. *Hybomitra distinguenda* (Verr.), a. female frons, b. male frons, c. female palpus, d. male palpus, e. female antenna, f. male antenna.

- 19 (6) Segments abdominaux postérieurs non comprimés latéralement, abdomen de forme habituelle, largement, arrondi à l'apex ; marges post-oculaires sur le vertex étroites, yeux avec peu de soies, voire nus (groupe *erberi*) 20
- Segments abdominaux postérieurs latéralement comprimés, abdomen nettement pointu (vue de dessus) ; marges post-oculaires sur le vertex larges ; yeux petits avec de nombreuses soies (groupe *acuminata*) *acuminata*

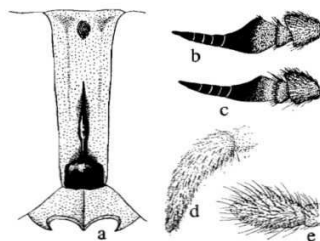


Fig. 76. *Hybomitra acuminata* (Lw.), a. female frons, b. female antenna, c. male antenna, d. female palpus, e. male palpus.

- 20 (19) Marques latérales marron-rouge, au plus sur les 3 premiers tergites, ventre avec une large bande médiane noir distincte sur les premiers sternites *expollicata*
 - Marques latérales marron-rouges sur les 4 à 5 premiers articles ; sternites antérieurs jaunes, au plus une tache noire médiane sur le sternite 2, pas de bande médiane *erberi*

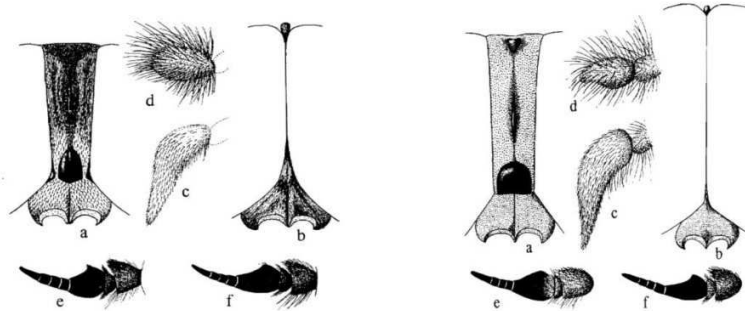


Fig. 72. *Hybomitra expollicata* (Panz.), a. female front, b. male front, c. female palpus, d. male palpus, e. female antenna, f. male antenna.

Fig. 74. *Hybomitra erberi* (Brauer), a. female front, b. male front, c. female palpus, d. male palpus, e. female antenna, f. male antenna.

Tabanus (femelles)

- 1 Soies sur les yeux, souvent avec 3 bandes ; espèces petites à moyennes (groupe *quatuornotatus*) 2
 - Absence de soies sur les yeux 6
 2 (1) Abdomen noir avec des motifs gris ou gris-argenté 3
 - Abdomen gris-olive ou marron avec des motifs clairs ou foncés, soies de la même couleur 5
 3 (2) Subcallus noir brillant ; front avec 3 calli noirs séparés, de taille égale ; 3 bandes sur les yeux *quatuornotatus*
 - Subcallus gris terne 4

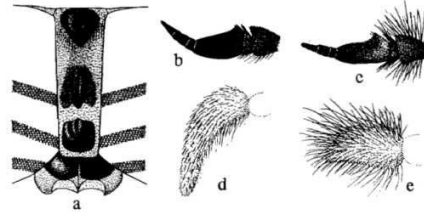


Fig. 88. *Tabanus quatuornotatus* Meig., a. female front, b. female antenna, c. male antenna, d. female palpus, e. male palpus.

- 4 (3) Callus médian linéaire, connecté à un large callus inférieur ; antennes noires, une bande (parfois incomplète) ou absence de bande sur les yeux *rupium*
 - Calli frontaux séparés, callus médian de forme ovale ; 3 bandes sur les yeux *nemoralis*

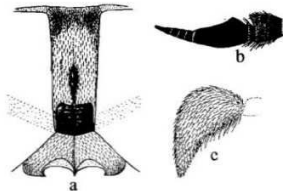


Fig. 90. *Tabanus rupium* Brauer, female, a. front, b. antenna, c. palpus.

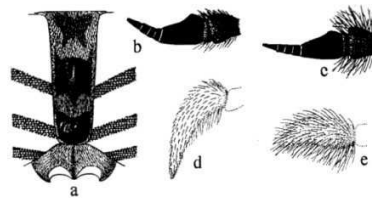
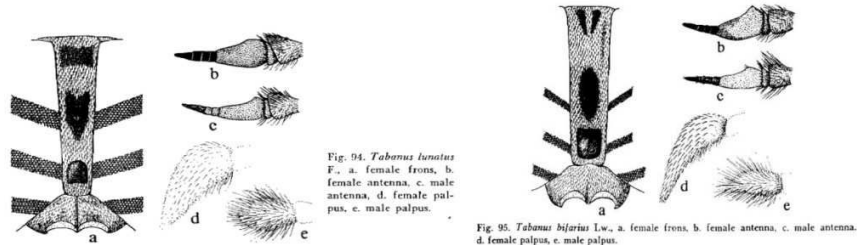
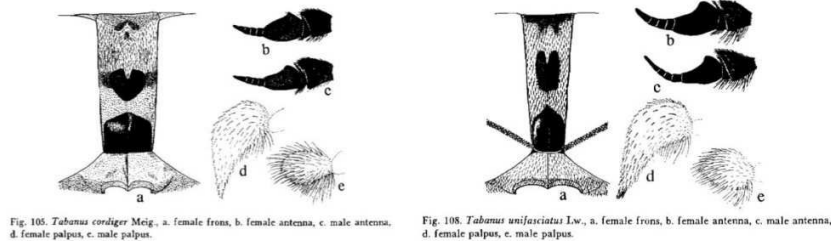


Fig. 89. *Tabanus nemoralis* Meig., a. female front, b. female antenna, c. male antenna, d. female palpus, e. male palpus.

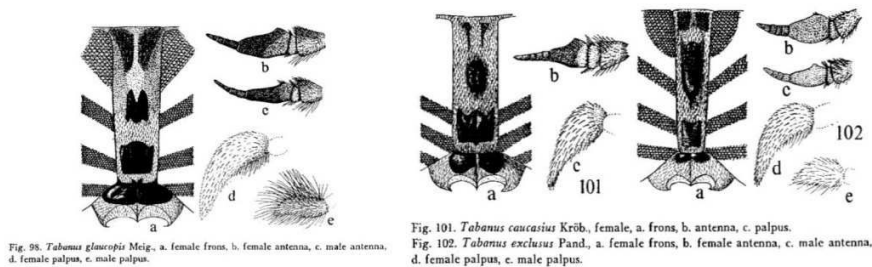
- 5 (2) Palpes gros (longueur égale à 3 fois la largeur) et en pointe ; abdomen avec habituellement les côtés des 4 tergites antérieurs marrons *lunatus*
 - Palpes plus longs et plus fins (longueur égale à 4 fois la largeur) ; callus inférieur jaune-marron *bifarius*



- 6 (1) Espèces petites à moyennes (longueur exceptionnellement égale à 18 mm) ; yeux bandés ou non 7
 - Espèces grandes (20 mm de longueur) ; yeux non bandés 11
- 7 (6) Callus médian de forme ovale ou transversale, relativement séparé du callus inférieur 8
 - Callus médian plus ou moins linéaire, relié au callus inférieur (groupe *bromius*) 11
- 8 (7) Subcallus d'aspect poudré ; front habituellement large, callus inférieur grand, plus large que haut, au contact du subcallus ; yeux bandés ou non (groupe *cordiger*) 9
 - Subcallus brillant, au moins sur la partie supérieure ; front plus étroit, callus inférieur plus haut que large, séparé du subcallus ; toujours 3 bandes sur les yeux (groupe *glaucoptis*) 10
- 9 (8) Absence de bandes sur les yeux *cordiger*
 - Une bande sur les yeux *unifasciatus*



- 10 (9) Espèce grande, 15,5-18 mm ; subcallus entièrement brillant noir ou marron-noir ; notopleures marron ; sternites antérieurs marron clair et sternites postérieurs gris clair *glaucoptis*
 - Espèce petites, au plus 15 mm ; subcallus gris, souvent brillant sur la moitié supérieure ou dans les coins supérieurs ; notopleures noirs ; tous les sternites gris clair *exclusus*



- 11 (7) Yeux non bandés 12
 - Yeux bandés 15
- 12 (11) Front large (1:3) ; espèce grande, 16-18 mm ; callus médian allongé mais plutôt large, non linéaire *briani*
 - Front moins large, espèce plus petite en général ; callus médian nettement linéaire
 13

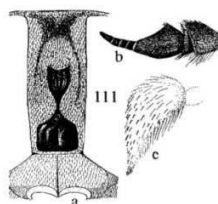


Fig. 111. *Tabanus briani* Lecl., female

- 13 (12) Front très étroit (1:5-6) 14
 - Front plus large (1:5) *miki*

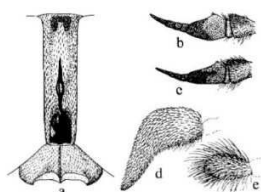


Fig. 113. *Tabanus miki* Brau, a. female front, b. female antenna, c. male antenna, d. female palpus, e. male palpus.

- 14 (13) Fémurs gris foncé ; antennes noires ou marron-rouge *regularis*
 - Fémurs jaune-rouge sauf à l'apex ; antennes très pales, jaune-rouge *darimonti*

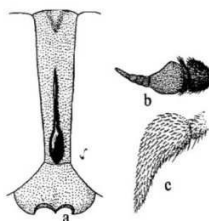


Fig. 116. *Tabanus darimonti* Lecl., female, a. front, b. antenna, c. palpus.

- 15 (11) 3 bandes sur les yeux ; front très étroit (1:6) ; espèce grande, 15-18 mm ; abdomen marron-rouge sur les côtés *tergestinus*
 - une bande sur les yeux ; front plus large (1:4-4,5) ; espèce plus petite 16

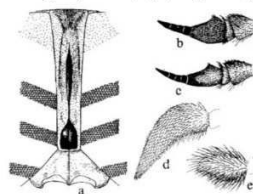
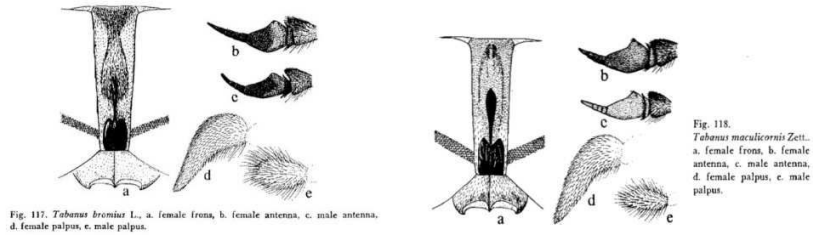


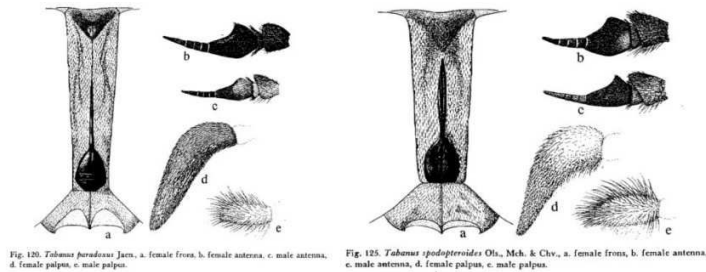
Fig. 119. *Tabanus tergestinus* Egg, a. female front, b. female antenna, c. male antenna, d. female palpus, e. male palpus.

- 16 (15) Marges post-oculaires sur le vertex étroites et avec des soies courtes et pales ; absence de soies noires à la base des antennes ; palpes renflés en pointes ; abdomen avec sur les côtés de petites tâches sublatérales le plus souvent marron, notopleures plutôt marrons *bromius*
- Marges post-oculaires sur le vertex remarquablement large et avec une rangée de soies longues et pales, présence de soies noires à la base des antennes ; palpes plus minces ; abdomen noirâtre avec des motifs grisâtres mal définis, tâches sublatérales plus grandes ; antennes unicolores marron, notopleures plutôt noirs *maculicornis*

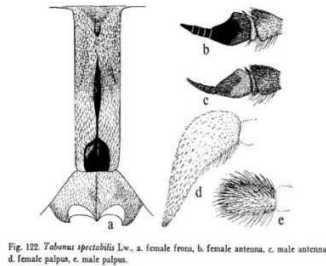


- 17 (6) Tibias postérieurs noirs, au plus marron translucide sur la face intérieure 18
- Tibias postérieurs marron au moins sur la moitié basale 19

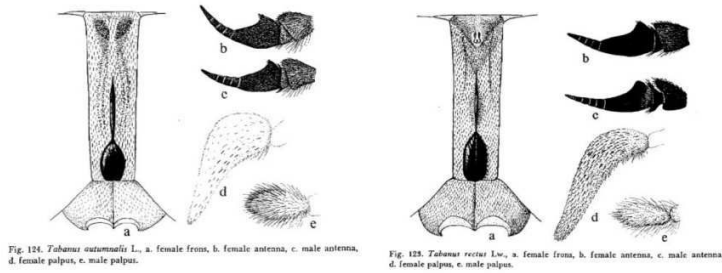
- 18 (17) Front étroit (1:5) ; palpes avec des soies noires, tergites noirs ; tibias postérieurs entièrement noirs *paradoxus*
- Front large (1:4) ; palpes avec des soies noires et blanches ; tergites noirs à marron-chataîgne ; tibias postérieurs marron translucides sur la face intérieure *spodopteroïdes*



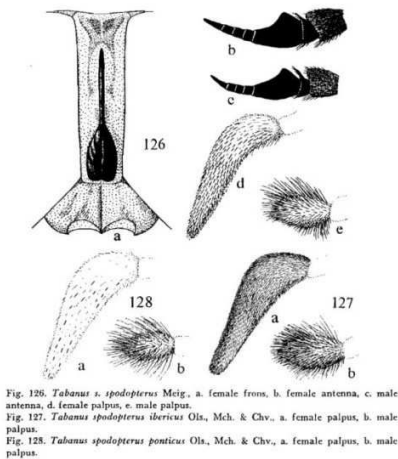
- 19 (17) Abdomen large, gris argenté, gris-rose à rouge sur les côtés, avec une bande noire médiane ; pas de triangles pales médians *spectabilis*
- Triangles pales médians plus ou moins nets ; si des taches latérales sont présentes, elles ne forment jamais de bandes 20



- 20 (19) Abdomen avec 3 rangées de taches gris clair ; espèces surtout gris-noir 21
 - Abdomen avec seulement une rangée de triangles pales médians, tergites essentiellement marron à marron-rouge sur les côtés 22
- 21 (19) Motifs abdominaux blancs remarquables, présence de taches latérales sur la marge postérieure de chaque tergite ; palpes avec des soies noires ; lobes notopleuraux noirâtres *rectus*
 - Motifs abdominaux gris, tâches sublatérales ovales n'atteignant pas les marges postérieurs des tergites, palpes avec surtout des soies blanches, lobes notopleuraux marron-jaune *autumnalis*



- 22 (20) Palpes gris à marron, densément couvert de soies courtes noires ou grises ; antennes noires ou marron-noir avec des segments flagellaires terminaux noirs 23
 - Palpes jaune-blanchâtres à marron-jaune, couvert de soies claires ou foncées ; segments des antennes marron à marron-jaune au moins à la base, antennes très rarement noires 24
- 23 (22) Présence de soies pales sur les côtés des sternites ; triangles médians présents sur au moins la moitié inférieure des tergites 2 et 3 *spodopterus spodopterus*
 - Présence surtout de soies foncées sur les côtés des sternites et seulement les marges postérieures avec des soies pales ; triangles médians présents sur au plus le tiers des tergites 2 et 3 *spodopterus ibericus*



- 24 (23) Callus frontal inférieur plus ou moins triangulaire, plus large à la base ; ventre marron sur la moitié antérieure avec des bandes médianes marron-noir ou les marges postérieures de tous les sternites blanchâtres 25
- Callus inférieur long et oval, plus large au milieu ; ventre surtout jaune-rouge ou marron clair ; si une bande médiane est présente, elle est rouge ou marron *eggeri*

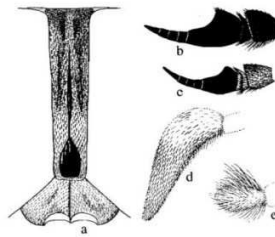


Fig. 133. *Tabanus eggeri* Schin., a. female frons, b. female antenna, c. male antenna, d. female palpus, e. male palpus.

- 25 (24) Ventre marron-noir avec de larges marges postérieures blanchâtres sur tous les sternites ; triangles médians avec les cotés plus ou moins droits n'atteignant pas les tergites précédents *sudeticus*
- Ventre marron à marron-jaune, avec une nette bande médiane marron foncée ; triangles médians avec les côtés plutôt concaves, atteignant habituellement les tergites précédents *bovinus*

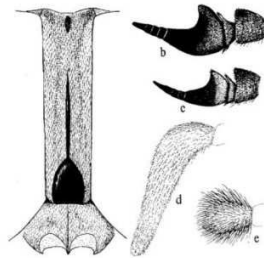


Fig. 130. *Tabanus sudeticus* Zettl., a. female frons, b. female antenna, c. male antenna, d. female palpus, e. male palpus.

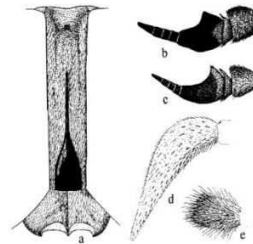


Fig. 131. *Tabanus bovinus* L., a. female frons, b. female antenna, c. male antenna, d. female palpus, e. male palpus.

Theriopectes

Theriopectes gigas

Haematopotini

Haematopota (femelles)

- 1 Segment 1 de l'antenne long, cylindrique et plutôt fin, au moins 4 fois aussi long que large, toujours entièrement poudré de gris, aussi long que la hauteur du front vue de dessus (groupe *italica*) 2
- Segment 1 de l'antenne, plus court, conique à ovale, au plus 3 fois aussi long que large, plus ou moins poli, seulement quelque fois poudré de gris, nettement plus court que la hauteur du front vue de dessus (groupe *pluvialis*) 5
- 2 (1) Taches sublatérales grises sur les tergites 2 à 6, parfois une petite tache sur le tergite 1 3
- Taches sulatérales grises au plus sur les tergites 3 à 6, le plus souvent sur les 2 ou 3 tergites postérieurs, ou absent 4

- 3 (2) Segment 3 de l'antenne plutôt fin, aussi large que le segment 1 ; bande apicale de l'aile très étroite et peu nette ; espèces plus grandes 11,5-13,5mm *grandis*
 - Segment 3 de l'antenne très large, presque 2 fois plus large que le segment 1 ; bande apicale de l'aile très large, qui occupe presque tout l'apex ; espèces plus petites 7,5-8mm

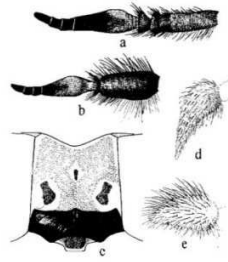


Fig. 138. *Haematopota grandis* Meig., a. female antenna, b. male antenna, c. female frons, d. female palpus, e. male palpus.

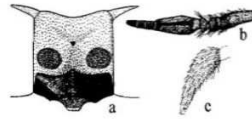


Fig. 142. *Haematopota lamhi* Vill., female, a. frons, b. antenna, c. palpus.

- 4 (2) Segment 1 de l'antenne jaune-marron, sans constriction subapicale, ou seulement une très petite constriction subapicale ; espèce majoritairement marron avec un front remarquablement étroit *pandazisi*
 - Segment 1 de l'antenne noir-gris, avec une constriction subapicale plus ou moins nette ; espèce généralement noire-grise avec un front large, à peine plus haut que large

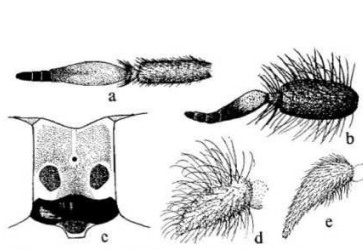


Fig. 139. *Haematopota pandazisi* (Kröb.), a. female antenna, b. male antenna, c. female frons, d. female palpus, e. male palpus.

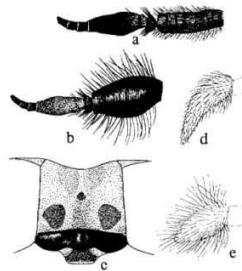


Fig. 140. *Haematopota italica* Meig., a. female antenna, b. male antenna, c. female frons, d. female palpus, e. male palpus.

- 5 (1) Segment 1 de l'antenne entièrement poudré de gris, au plus légèrement brillant avant l'extrémité 6
 - Segment 1 de l'antenne noir brillant, au moins nettement brillant sur le quart apical 7
 6 (5) Clypeus avec une paire de petites taches noires, antennes longues, segment 1 au moins 2,5 fois plus long que large, segment 3 plus fin que le segment 1 *gallica*
 - Clypeus unicolore gris-blanc sans ces taches, grosses antennes courtes, segment 3 au moins aussi large que le segment 1

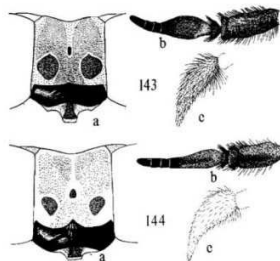


Fig. 143. *Haematopota gallica* Scit., female, a. frons, b. antenna, c. palpus.
 Fig. 144. *Haematopota newelli* Aust., female, a. frons, b. antenna, c. palpus.

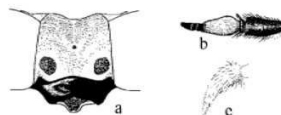


Fig. 147. *Haematopota csikii* Scit., female, a. frons, b. antenna, c. palpus.

- 7 (5) Segment 1 de l'antenne poudré de gris au moins sur le dessus du quart basal 8
 - Segment 1 entièrement noir brillant ; front toujours large, plus large que haut ; pas de constriction sur le segment 1 de l'antenne *crassicornis*

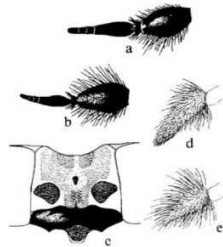


Fig. 154. *Haematopota crassicornis* Walsb., a. female antenna, b. male antenna, c. female frons, d. female palpus, e. male palpus.

- 8 (7) Front large, nettement plus large que haut ; antennes noires sans marron à la base du segment 3, ce dernier étant plutôt large 9
 - Front plus étroit, nettement plus haut que large, ou de forme carré ; antennes au moins légèrement marron à la base du segment 3, ce dernier étant plutôt mince 10

- 9 (8) Segment 1 de l'antenne gros et très court, longueur inférieure à 2 fois la largeur, finement poudré de gris sur moins de la moitié basale ; fémurs plus ou moins marron au milieu *pseudolusitanica*
 - Segment 1 de l'antenne cylindrique, longueur supérieure à 2 fois la largeur, poudré de gris sur plus de la moitié basale, au-dessus ; fémurs gris-noir *ocelligera*

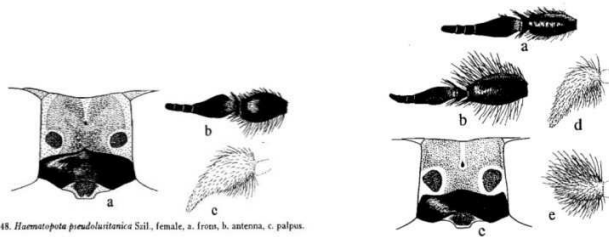


Fig. 148. *Haematopota pseudolusitanica* Sait., female, a. frons, b. antenna, c. palpus.

Fig. 149. *Haematopota ocelligera* (Krieh.), a. female antenna, b. male antenna, c. female frons, d. female palpus, e. male palpus.

- 10 (8) Segment 1 de l'antenne de forme irrégulière, avec une constriction profonde avant l'extrémité ; espèce généralement poudré de gris-olive ; ailes marron à marron foncé ; fémurs gris-noir ... *pluvialis*
 - Segment 1 de l'antenne uniformément oval à cylindrique, au plus avec une petite constriction avant l'extrémité ; espèces généralement noires ou gris clair 11

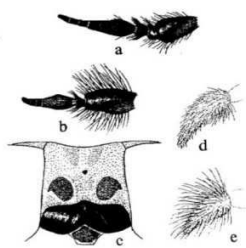


Fig. 150. *Haematopota pluvialis* (L.), a. female antenna, b. male antenna, c. female frons, d. female palpus, e. male palpus.

- 11 (10) Espèces plutôt noires ; scutellum avec une grande tache blanc-gris ; front avec une paire de grandes taches noir-velours, touchant habituellement le callus et les marges oculaires; ailes marron foncé ; segment 1 de l'antenne noir brillant au moins sur la moitié apicale *scutellata*
- Espèces généralement gris clair ; scutellum sans tache pale, de la même couleur que le mesonotum ; taches sur le front plus petites, séparées du callus et des marges oculaires ; ailes gris clair ; segment 1 de l'antenne noir brillant seulement sur le quart apical 12

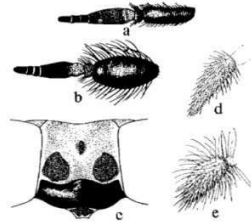


Fig. 151. *Haematopota scutellata* (Ols., Mch. & Chv.). a. female antenna, b. male antenna, c. female frons, d. female palpus, e. male palpus.

- 12 (11) Segment 1 de l'antenne noir ; tous les fémurs gris-noir ; tergites 3 à 7 avec des taches sublatales grises nettes mais plutôt petites, parfois des taches petites aussi sur le tergite 2 *subcylindra*
- Segment 1 de l'antenne plus ou moins marron à la base ; fémurs considérablement jaune-marron ; tous les tergites avec de grandes taches sublatales blanc-gris, rarement absentes sur le tergite 1 *bigoti*

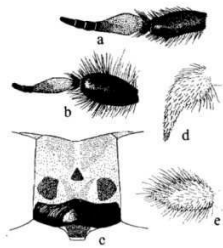


Fig. 153. *Haematopota bigoti* Gobl., a. female antenna, b. male antenna, c. female frons, d. female palpus, e. male palpus.

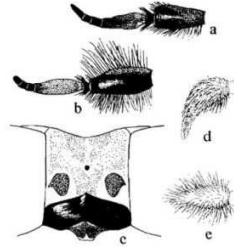


Fig. 152. *Haematopota subcylindrica* Paud., a. female antenna, b. male antenna, c. female frons, d. female palpus, e. male palpus.

Heptatoma

Heptatoma pellucens

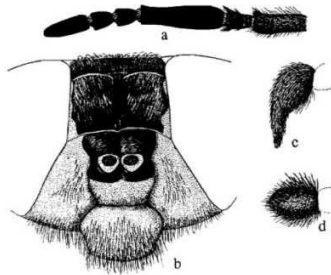


Fig. 156. *Heptatoma pellucens* (F.), a. female antenna, b. female frons and face, c. female palpus, d. male palpus.

Diachlorini

Dasyrhampis

- 1 Pattes bicolores, tibias marron ; palpes poudrés de gris avec des soies courtes et pâles *tomentosus*
- Pattes unicolores noires ; palpes noires avec des soies noires 2

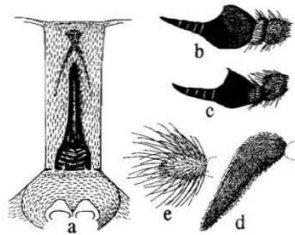


Fig. 163. *Dasyrhampis tomentosus* (Macq.), a. female frons, b. female antenna, c. male antenna, d. female palpus, e. male palpus.

- 2 (1) Segment 3 de l'antenne avec une coupure marquée et une dent dorsale longue et pointue en forme de crochet, dirigé vers l'avant 3
- Segment 3 de l'antenne avec une dent dorsale moins développée, au plus rectangulaire et sans aucune coupure *nigritus*

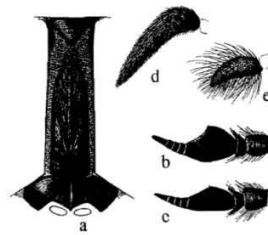


Fig. 161. *Dasyrhampis nigritus* (F.), a. female frons, b. female antenna, c. male antenna, d. female palpus, e. male palpus.

- 3 (2) Subcallus entièrement noir brillant chez la femelle, parfois extrêmement poudré chez le mâle ; ailes fumées uniformément marron foncé ; calypter foncé avec une marge très foncée et une frange foncée ; espèces généralement grandes, 14-18,5mm *ater*
- Subcallus noir brillant chez les 2 sexes ; ailes fumées marron, partie centrale de la base à l'apex de la cellule discale semihyaline ; calypter jaunâtre avec des franges pâles ; espèces généralement plus petites 14-16,5mm *anthracinus*

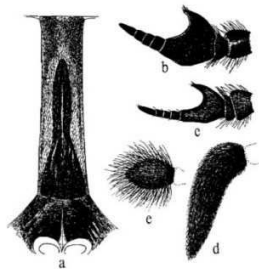


Fig. 158. *Dasyrhampis ater* (Rozs.), a. female frons, b. female antenna, c. male antenna, d. female palpus, e. male palpus.

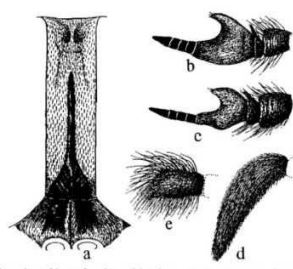


Fig. 159. *Dasyrhampis anthracinus* (Meig.), a. female frons, b. female antenna, c. male antenna, d. female palpus, e. male palpus.

Philipomyia

- Segment 3 de l'antenne jaune-orange, avec une grande dent dorsale et pointue en forme de crochet dirigée vers l'avant et partie terminale du flagellum foncé ; les 3 premiers tergites jaune-marron sur les côtés avec le plus souvent une bande médiane noire étroite ; abdomen avec surtout des soies jaune doré ; haltères jaunâtres *graeca*
- Segment 3 de l'antenne rouge-marron ; les 3 tergites antérieurs marron sur les côtés ; haltères jaune-marron *aprica*

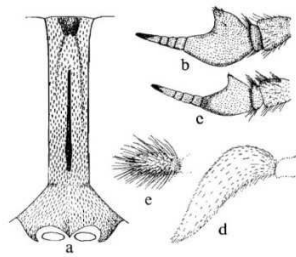


Fig. 156. *Philipomyia graeca* (F.), a. female frons, b. female antenna, c. male antenna, d. female palpus, e. male palpus.

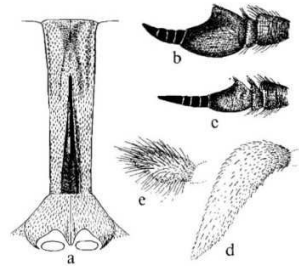


Fig. 155. *Philipomyia aprica* (Meig.), a. female frons, b. female antenna, c. male antenna, d. female palpus, e. male palpus.

Chvála, M., Lyneborg, L. & Moucha, J. (1972). *The horse flies of Europe (Diptera, Tabanidae)*. Entomological Society of Copenhagen, Copenhagen.

Annexe 4. Réponses des Tabanidae au CO₂

Table B. Responses of tabanids to traps baited with carbon dioxide

Species	Country	Trap	CO2 (débit en L/min)	CI*	References
<i>Philoliche zonata</i>	South Africa	Electrocuting screen	3	30	[1]
Tabanidae	Zimbabwe	Black cylinder	2.5	6	[2]
Tabanidae	Zimbabwe	Black cylinder	15	37	[2]
<i>Cryptotylus unicolor</i> , <i>Chlorotabanus</i> spp.	French Guyana	Malaise trap	-	18.3	[3]
<i>Tabanus quinquevittatus</i>	Canada	Canopy trap	4-8	9	[4]
<i>Tabanus subsimilis</i>	United States	Malaise trap	3.5	3	[5]
<i>Tabanus sulcifrons</i>	United States	Malaise trap	3.5	16	[5]
<i>Tabanus fuscicostatus</i>	United States	Canopy trap	5kg dry ice/3h	8.5	[6]
<i>Tabanus lineola</i>	United States	Canopy trap	5kg dry ice/3h	8.5	[6]
<i>Diachlorus ferrugatus</i>	United States	CDC trap	0.02	4	[7]
<i>Diachlorus ferrugatus</i>	United States	CDC trap	0.2	27	[7]
<i>Diachlorus ferrugatus</i>	United States	CDC trap	2	90	[7]
<i>Tabanus nigrovittatus</i>	United States	Box trap	1-1.5kg dry ice/3-4h	4	[8]
<i>Tabanus pallidescens</i>	United States	French 2-tier box trap	0.5	6.2	[9]

*Catch index is the catch of trap baited with the attractant expressed as a proportion of an unbaited trap

References of the Table B

1. Phelps RJ, Vale GA (1976) Studies on the local distribution and on the methods of host location of some Rhodesian Tabanidae (Diptera). *Journal of the Entomological Society of South Africa*. 39: 67-81.
2. Vale GA (1980) Field studies of the responses of tsetse flies (Glossinidae) and other diptera to carbon dioxide, acetone and other chemicals. *Bulletin of Entomological Research*. 70: 563-570.
3. Raymond HL (1987) Intérêt des pièges de malaise appâtés au gaz carbonique pour l'étude des taons crépusculaires (Diptera, Tabanidae) de Guyane Française. *International Journal of Tropical Insect Science*. 8: 337-341.
4. Leprince DJ, Jolicœur P (1986) Response to carbon dioxide of *Tabanus quinquevittatus* Wiedemann females (Diptera, Tabanidae) in relation to relative abundance, parity, follicle development, and sperm and fructose presence. *Canadian Entomologist*. 118: 1273-1277.
5. Roberts RH (1972) Relative attractiveness of CO₂ and a steer to Tabanidae, Culicidae and *Stomoxys calcitrans* (L). *Mosquito News*. 32: 208-211.
6. Leprince DJ, Hribar LJ, Foil LD (1994) Responses of horse flies (Diptera, Tabanidae) to Jersey Bullocks and canopy traps baited with ammonia, octenol and carbon dioxide. *Journal of Medical Entomology*. 31: 729-731.
7. Kline DL, Wood JR, Cornell JA (1991) Interactive effects of 1-octen-3-ol and carbon dioxide on mosquito (Diptera, Culicidae) surveillance and control. *Journal of Medical Entomology*. 28: 254-258.
8. Hayes RO, Doane OW, Sakolsky G, Berrick S (1993) Evaluation of attractants in traps for greenhead fly (Diptera: Tabanidae) collections on a Cape Cod, Massachusetts, salt marsh. *J Am Mosq Control Assoc* 9: 436-440.
9. Cilek JE, Olson MA (2008) Effects of carbon dioxide, an octenol/phenol mixture, and their combination on Tabanidae (Diptera) collections from French 2-tier box traps. *Journal of Medical Entomology*. 45: 638-642.

Annexe 5. Réponses des Tabanidae à différents attractifs (autres que le CO₂)

Table C. Responses of tabanids to traps baited with various attractants other than carbon dioxide

Species	Country	Trap	Attractants (other than CO ₂)	CI*	References
<i>Atylotus loewianus</i>	Croatia	Canopy trap	Octenol	8.5	[1]
			Aged horse urine	8	
<i>Tabanus bromius</i>	Croatia	Canopy trap	Aged horse urine+acetone	4.7	[1]
			Octenol	8	
<i>Tabanus maculicornis</i>	Croatia	Canopy trap	Aged horse urine	7.5	[1]
			Aged horse urine+acetone	3	
<i>Tabanus tergestinus</i>	Croatia	Canopy trap	Octenol	15	[1]
			Aged horse urine	14.7	
<i>Tabanus tergestinus</i>	Croatia	Canopy trap	Aged horse urine+acetone	14	[1]
			Octenol	10	
<i>Tabanus sudeticus</i>	Croatia	Canopy trap	Aged horse urine	6	[1]
			Aged horse urine+acetone	5	
<i>Haematopota pluvialis</i>	Croatia	Canopy trap	Octenol	5	[1]
			Aged horse urine	6	
<i>Tabanus bromius</i>	Croatia	Malaise trap	Aged horse urine+acetone	3	[2]
			Octenol	29.5	
<i>Haematopota pluvialis</i>	Croatia	Malaise trap	Acetone	11.5	[2]
			Ammonium hydroxide	5	
<i>Tabanus bromius</i>	Croatia	Canopy trap	Octenol	20.5	[3]
			Aged cow urine	110	
<i>Haematopota pluvialis</i>	Croatia	Canopy trap	Aged horse urine	75	[3]
			Aged sheep urine	65	
<i>Tabanus bromius</i>	Croatia	Canopy trap	Aged pig urine	30	[3]
			Aged cow urine	22	
<i>Haematopota pluvialis</i>	Croatia	Canopy trap	Aged horse urine	20	[3]
			Aged sheep urine	13	
<i>Tabanus bromius</i>	Croatia	Canopy trap	Aged pig urine	14.5	[4]
			4MP	17.5	
<i>Tabanus bromius</i>	Croatia	Canopy trap	3-isopropylphenol	1.7	[5]
			Naphthalene	1.5	
<i>Tabanus bromius</i>	Croatia	Canopy trap	Octenol+acetone+ammonia (5:3:2)	24	[5]
			Aged donkey urine	20	
<i>Tabanus bromius</i>	Croatia	Canopy trap	Lactic acid	4	[6]
			Fresh human urine	2.2	
<i>Tabanus bromius</i>	Croatia	Canopy trap	Aged horse urine	6.4	[6]
<i>Tabanus tergestinus</i>	Croatia	Canopy trap	Aged horse urine	6.4	[6]
<i>Morellia spp.</i>	Danemark	Canopy trap	Octenol	1.2	[7]
<i>Hybomitra expollicata</i>	Danemark	Canopy trap	Octenol+ammonia	1.6	[7]
			Octenol	5.9	
<i>Haematopota pluvialis</i>	Danemark	Canopy trap	Octenol+ammonia	8.6	[7]
			Octenol	4.2	
<i>Tabanus bromius</i>	France	Nzi trap	Octenol+ammonia	4.3	[8]
<i>Atylotus quadrifarius</i>	France	Nzi trap	Aged horse urine	1.6	[8]
<i>Tabanus bromius</i>	France	Nzi trap	Aged horse urine	3.5	[8]
			Aged sheep urine	2.5	
<i>Tabanus bromius</i>	France	Nzi trap	Octenol+ammonia	2	[9]
			4MP+3PP (16 :1)+ammonia	1.8	
<i>Atylotus quadrifarius</i>	France	Nzi trap	Aged horse urine	2.2	[9]
			Octenol+ammonia	2.8	
<i>Hybomitra lundbecki</i>	Norway	Flight trap	4MP+3PP (16 :1)+ammonia	2.7	[10]
			Aged horse urine	4.1	
<i>Tabanus townsvilli</i>	Australia	Nzi trap and Canopy trap	Octenol	9	[11]
<i>Pseudotabanus silvester</i>	Australia	Nzi trap and Canopy trap	Octenol	3.5	[11]
<i>Dasybasis clavicallosa</i>	Australia	Nzi trap and Canopy trap	Octenol	2.5	[11]
<i>Tabanus strangmannii</i>	Australia	Nzi trap and Canopy trap	Octenol	4	[11]
<i>Tabanus pallipennis</i>	Australia	Nzi trap and Canopy trap	Octenol	2	[11]
<i>Tabanus quinquevittatus</i>	Canada	Nzi trap	Octenol	10	[11]
<i>Tabanus similis</i>	Canada	Nzi trap	Octenol	2	[12]
<i>Hybomitra lasiophthalma</i>	Canada	Nzi trap	Octenol	1.5	[12]

<i>Chrysops univittatus</i>	Canada	Nzi trap	Octenol	1.2	[12]
<i>Chrysops aberrans</i>	Canada	Nzi trap	Octenol	1.2	[12]
<i>Tabanus quinquevittatus</i>	Canada	Sticky enclosure around a Nzi trap	Octenol	3.5	[12]
<i>Hybomitra lasiophthalma</i>	Canada	Nzi trap	Aged cow urine	1.9	[13]
			Aged cow urine+octenol	2.6	
<i>Hybomitra epistates</i>	Canada	Nzi trap	Octenol	1.7	[14]
			Aged cow urine	1.8	
			4MP+3PP (8:1)	3.1	
			4MP+3PP (8:1)+octenol	5	
			4MP+3PP (8:1)+octenol+ammonia	3.2	
<i>Hybomitra lasiophthalma</i>	Canada	Nzi trap	Octenol	1.8	[14]
			4MP+3PP (8:1)+octenol	2	
			4MP+3PP (8:1)+octenol+ammonia	2.1	
<i>Hybomitra illota</i>	Canada	Nzi trap	4MP+3PP (8:1)+octenol	2.7	[14]
			4MP+3PP (8:1)+octenol+ammonia	4	
<i>Hybomitra lurida</i>	Canada	Nzi trap	4MP+3PP (8:1)+octenol	1.7	[14]
			4MP+3PP (8:1)+octenol+ammonia	2	
<i>Hybomitra affinis</i>	Canada	Nzi trap	4MP+3PP (8:1)+octenol	3.5	[14]
			4MP+3PP (8:1)+octenol+ammonia	3	
<i>Hybomitra arpadi</i>	Canada	Nzi trap	4MP+3PP (8:1)+octenol	1.8	[14]
			4MP+3PP (8:1)+octenol+ammonia	2.8	
<i>Hybomitra frontalis</i>	Canada	Nzi trap	4MP+3PP (8:1)+octenol+ammonia	1.7	[14]
<i>Tabanus nigrovittatus</i>	United States	Box trap	Octenol	1.8	[15]
<i>Tabanus fuscicostatus</i>	United States	Canopy trap	Octenol	2	[16]
			Octenol+4MP+3PP (4:8:1)	1.7	
<i>Tabanus molestus</i>	United States	Canopy trap	Octenol	3.5	[17]
<i>Chrysops atlanticus</i>	United States	Canopy trap	Octenol	2	[18]
<i>Hybomitra vicina</i>	United States	Canopy trap	Octenol	9	[18]
<i>Tabanus lineola hinellus</i>	United States	Canopy trap	Octenol	5	[18]
<i>Diachlorus ferrugatus</i>	United States	CDC trap	Octenol	1.6	[19]
<i>Hybomitra lasiophthalma</i>	United States	Canopy trap	Ammonia	2.5	[20]
Tabanidae (<i>A. agrestis</i> ?)	Burkina Faso	NG2G	3MP+octenol (3:1)	1.8	[21]
Tabanidae (<i>A. agrestis</i> ?)	Burkina Faso	F3	3MP+octenol (3:1)	2.3	[21]
Tabanidae	Guinea-Bissau	Biconical trap	Octenol+4MP+3PP (4:8:1)	4.3	[22]
			Octenol+4MP+3PP (4:8:1)+acetone	4.7	
			Octenol+4MP+3PP (4:8:1)+acetone+urine	6.3	
<i>Tabanus spp.</i>	Mali	Pyramidal trap	Octenol+acetone	2	[23]
(<i>T. gratus</i> and <i>T. taeniola</i>)			Octenol+acetone+cow urine	2.4	
			Octenol+acetone+3MP	2.7	
<i>Tabanus spp.</i>	Mali	Vavoua trap	Octenol+3MP	3.4	[23]
(<i>T. gratus</i> and <i>T. taeniola</i>)			Octenol+acetone	2.8	
			Octenol+acetone+cow urine	5.1	
			Octenol+acetone+3MP	2.1	
<i>Tabanus pullulus</i>	Zimbabwe	F3	Octenol	4.7	[24]
			4MP	2.7	
			4MP+3PP	2.7	
			Octenol+4MP+3PP (4:8:1)	6.2	
<i>Tabanus copemani</i>	Zimbabwe	F3	Octenol	7.5	[24]
			4MP	3	
			3PP	2	
			4MP+3PP	3	
			Octenol+4MP+3PP (4:8:1)	9.5	

*Catch index is the catch of trap baited with the attractant expressed as a proportion of an unbaited trap

References of the Table C

1. Krëmar S, Hribar LJ, Kopi MA (2005) Response of Tabanidae (Diptera) to natural and synthetic olfactory attractants. *Journal of Vector Ecology*. 30: 133-136.
2. Krëmar S (2005) Response of horse flies (Diptera, Tabanidae) to different olfactory attractants. *Biologia*. 60: 611-613.
3. Krëmar S, Mikuska A, Merdić E (2006) Response of Tabanidae (Diptera) to different natural attractants. *Journal of Vector Ecology*. 31: 262-265.
4. Krëmar S (2007) Responses of Tabanidae (Diptera) to canopy traps baited with 4-methylphenol, 3-isopropylphenol, and naphthalene. *Journal of Vector Ecology*. 32: 188-192.
5. Krëmar S, Mikuska A, Radolj V (2010) Comparison of sampling tabanids (Diptera: Tabanidae) by four different potential attractants. *Journal of Applied Entomology*. 134: 608-613.
6. Krëmar S, Lajos P (2011) Response of Horse Flies to Aged Equine urine (Diptera: Tabanidae). *Entomologia Generalis*. 33: 245-250.
7. Kristensen PK, Sommer C (2000) Ammonia and 1-octen-3-ol as attractants for *Haematopota pluvialis*, *Hybomitra expollicata* (Diptera: Tabanidae), and *Morellia* spp. (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology*. 37: 984-985.
8. Baldacchino F, Cadier J, Porciani A, Buatois B, Dormont L, et al. (2013) Behavioural and electrophysiological responses of females of two species of tabanid to volatiles in urine of different mammals. *Medical and Veterinary Entomology* 27: 77-85.
9. Baldacchino F, Manon S, Puech L, Buatois B, Dormont L, et al. (2013) Olfactory and behavioural responses of tabanids to octenol, phenols and aged horse urine. *Medical and Veterinary Entomology*. In press.
10. Nilssen A (1998) Effect of 1-octen-3-ol in field trapping *Aedes* spp. (Dipt., Culicidae) and *Hybomitra* spp. (Dipt., Tabanidae) in subarctic Norway. *Journal of Applied Entomology-Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie*. 122: 465-468.
11. Van Hennekeler K, Jones RE, Skerratt LF, Fitzpatrick LA, Reid SA, et al. (2008) A comparison of trapping methods for Tabanidae (Diptera) in North Queensland, Australia. *Medical and Veterinary Entomology*. 22: 26-31.
12. Mihok S, Carlson DA, Ndegwa PN (2007) Tsetse and other biting fly responses to Nzi traps baited with octenol, phenols and acetone. *Medical and Veterinary Entomology*. 21: 70-84.
13. Mihok S, Mulye H (2010) Responses of tabanids to Nzi traps baited with octenol, cow urine and phenols in Canada. *Medical and Veterinary Entomology*. 24: 266-272.
14. Mihok S, Lange K (2012) Synergism between ammonia and phenols for *Hybomitra* tabanids in northern and temperate Canada. *Medical and Veterinary Entomology*. 26: 282-290.
15. Hayes RO, Doane OW, Sakolsky G, Berrick S (1993) Evaluation of attractants in traps for greenhead fly (Diptera: Tabanidae) collections on a Cape Cod, Massachusetts, salt marsh. *Journal American Mosquito Control Association*. 9: 436-440.
16. Foil LD, Hribar LJ (1995) Evaluation of tsetse attractants as baits for horse flies and deer flies (Diptera, Tabanidae) in Louisiana. *Florida Entomologist*. 78: 129-133.
17. French FE, Kline DL (1989) 1-octen-3-ol, an effective attractant for Tabanidae (Diptera). *Journal of Medical Entomology*. 26: 459-461.
18. Schreck CE, Kline DL, Williams DC, Tidwell MA (1993) Field evaluations in malaise and canopy traps of selected targets as attractants for tabanid species (Diptera, Tabanidae). *Journal of the American Mosquito Control Association*. 9: 182-188.
19. Kline DL, Dame DA, Meisch MV (1991) Evaluation of 1-octen-3-ol and carbon dioxide as attractants for mosquitoes associated with irrigated rice-fields in Arkansas. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 7: 165-169.
20. Hribar LJ, Leprince DJ, Foil LD (1992) Ammonia as an attractant for adult *Hybomitra lasiophthalma* (Diptera, Tabanidae). *Journal of Medical Entomology*. 29: 346-348.
21. Amsler S, Filledier J (1994) Attractivité pour les Tabanidae de l'association méta-crésol/octénol : Résultats obtenus au Burkina Faso. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*. 47: 93-96.
22. Jaenson TGT, Dossantos RCB, Hall DR (1991) Attraction of *Glossina longipalpis* (Diptera: Glossinidae) in Guinea-Bissau to odor-baited biconical traps. *Journal of Medical Entomology*. 28: 284-286.
23. Djiteye A, Diarra M, Ouattara I, Traore D (1998) Comparison of the efficacy of different traps and attractants for Tabanidae and *Stomoxys* in Mali. *Journal of Protozoology Research*. 8: 263-273.
24. Phelps RJ, Holloway MTP (1992) Catches of tabanidae in response to visual and odour attractants in Zimbabwe. *Journal of African Zoology*. 106: 371-380.

Annexe 6. The repellency of lemongrass oil against stable flies, tested using video tracking

The repellency of lemongrass oil against stable flies, tested using video tracking

Frédéric Baldacchino^{1,*}, Coline Tramut¹, Ali Salem², Emmanuel Liénard², Emilie Delétré³, Michel Franc², Thibaud Martin³, Gérard Duvallet¹, and Pierre Jay-Robert¹

¹ Dynamique et Gouvernance des Systèmes Écologiques, Centre d'Écologie Fonctionnelle et Évolutive (CEFE), UMR 5175, Université Paul-Valéry (UM3), Montpellier, France

² Laboratoire de Parasitologie, École Nationale Vétérinaire (ENVT), Toulouse, France

³ Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), UR-Hortsys, Montpellier, France

Received 25 February 2013, Accepted 31 May 2013, Published online 13 June 2013

Abstract – Lemongrass oil (*Cymbopogon citratus*) is an effective repellent against mosquitoes (Diptera: Culicidae) and house flies (Diptera: Muscidae). In this study, its effectiveness was assessed on stable flies (Diptera: Muscidae) in laboratory conditions. First, we demonstrated that lemongrass oil is an active substance for antennal olfactory receptor cells of *Stomoxys calcitrans* as indicated by a significant increase in the electroantennogram responses to increasing doses of lemongrass oil. Feeding-choice tests in a flight cage with stable flies having access to two blood-soaked sanitary pads, one of which was treated with lemongrass oil, showed that stable flies ($n = 24$) spent significantly more time in the untreated zone (median value = 218.4 s) than in the treated zone (median value = 63.7 s). No stable flies fed on the treated pad, whereas nine fed on the untreated pad. These results suggest that lemongrass oil could be used as an effective repellent against stable flies. Additional studies to confirm its spatial repellent and feeding deterrent effects are warranted.

Key words: *Stomoxys calcitrans*, stable fly, repellent, lemongrass, *Cymbopogon citratus*, video tracking.

Résumé – **Activité répulsive de l'huile essentielle de citronnelle contre les stomoxes, testée par tracking vidéo.** L'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* est un répulsif actif contre les moustiques (Diptera : Culicidae) et les mouches domestiques (Diptera : Muscidae). Dans cette étude, nous avons testé son efficacité contre les stomoxes (Diptera : Muscidae) en laboratoire. Nous avons tout d'abord démontré par électroantennographie (EAG) que l'huile essentielle de *C. citratus* était une substance active sur les récepteurs olfactifs des antennes de *Stomoxys calcitrans*, par la mise en évidence d'une augmentation significative des réponses EAG à des doses croissantes d'huile essentielle. Des tests de choix réalisés en cage de vol avec des stomoxes ayant à disposition deux supports imprégnés de sang, l'un ayant été traité avec de l'huile essentielle, montrent que les stomoxes ($n = 24$) ont passé significativement plus de temps dans la zone non traitée (valeur médiane = 218,4 s) que dans la zone traitée (valeur médiane = 63,7 s). Aucun stomoxe ne s'est nourri sur le support traité alors que neuf stomoxes se sont nourris sur le support non traité. Ces résultats suggèrent que l'huile essentielle de *C. citratus* pourrait être utilisée comme répulsif contre les stomoxes. Des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer ses effets répulsifs et anti-gorgement.

Introduction

The stable fly *Stomoxys calcitrans* L. is among the most damaging arthropod pest of livestock worldwide [8, 15, 23], with a high economic impact on dairy and beef cattle production [3, 27, 39]. It is also a potential mechanical vector of animal pathogens such as equine infectious anemia virus, *Trypanosoma evansi*, and *Besnoitia besnoiti* [7, 9, 19]. Control

of stable fly populations includes various methods, such as chemical control (pesticides and repellents), cultural control (sanitation), mechanical control (trapping devices), and biological control (parasitoids and entomopathogenic fungi) [9, 20]. The best approach is the simultaneous use of several methods in an integrated pest-management program [26]. Management of adult flies is accomplished mainly with topical insecticides, applied directly to animals. However, continued or repeated use of conventional insecticides often results in the development of resistance and fosters serious human health and environmental

*Corresponding author: frederic.baldacchino@yahoo.fr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

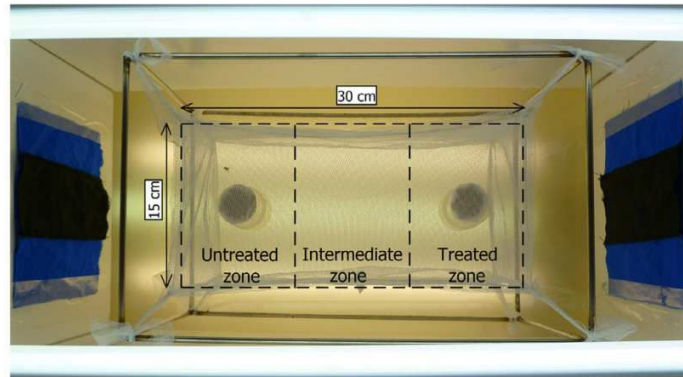


Figure 1. Aerial view of the system for spatial repellency bioassays. The screen cage was made of mosquito netting suspended on a metal frame and surrounded by white foam board with blue and black fabric on each side. Two blood-soaked sanitary pads were set under the cage: one, impregnated with lemongrass oil, was placed in the treated zone, and the other, impregnated with hexane, was placed in the untreated zone. For further details see Materials and Methods section.

concerns [13, 42]. Populations of *S. calcitrans* resistant to pyrethroids and/or organophosphates have already been described in North America and in Europe [4, 21, 31, 34]. As a result, there have been increased research efforts for natural and environmentally friendly repellents, particularly those based on essential oils [38]. Several plant-based repellents, such as citronella oil, eucalyptus oil, catnip oil, and zanthoxylum oil, have previously been tested against stable flies and have shown a reduction in attraction and in feeding [1, 13, 40, 43]. These repellents can be applied topically on animals or in livestock barns [13]. The first study demonstrating the potential application of a plant-based repellent was conducted by Zhu *et al.* [44], in which wax-based catnip pellets spread in the manure/soil areas of cattle feedlots resulted in over 99% repellency of stable flies.

Lemongrass oil is the essential oil obtained from the aerial parts of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., Poaceae [29]. Geraniol (α -citral) and neral (β -citral) are the two main active components of lemongrass oil, but other compounds, such as geraniol and citronellol, which are known repellents, are also present in small amounts [2, 18, 38]. Lemongrass essential oil has previously shown a repellent effect, alone or in combination, against different species of disease-transmitting mosquitoes (Diptera: Culicidae) and the house fly *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) [16, 25, 30, 37], and is already present in commercially available products [5, 32]. Therefore, our objectives were to verify the sensitivity of antennal receptor cells of *S. calcitrans* to lemongrass oil and to evaluate its repellency against stable flies using a video-tracking system.

Materials and methods

Insects

Stomoxys calcitrans pupae were obtained from the laboratory colony of the National Veterinary School of Toulouse

(Toulouse, France) [35]. Newly emerged flies were not sexed. Males and females were enclosed together in a cotton mesh cage (40 cm W \times 25 cm H \times 25 cm D) at 24 ± 2 °C with 40–50% relative humidity. Flies were fed with 10% sugar water *ad libitum* and, once a day, with citrated bovine blood. Experiments were conducted with 2–4-day-old flies. Flies were not fed for 24 h prior to each test.

Electroantennogram recording

Following the method used in the study by Jeanbourquin and Guerin [14], electroantennogram (EAG) recordings from antennae of *S. calcitrans* were made with an EAG recording device (EAG combi probe internal gain $\times 10$, CS-55 stimulus controller and IDAC-2 signal acquisition controller, Syntech, Hilversum, the Netherlands). Recordings were made using electrolyte-filled (0.1 M KCl) glass capillary electrodes (\varnothing 1.5 mm, 40 mm L), with Ag/AgCl wire (\varnothing 0.5 mm, 20 mm L) making contact with the recording apparatus. The antenna was maintained in a humidified charcoal-filtered air stream delivered at 14.6 mL/s through a metal tube. Aliquots of pure lemongrass oil (from *C. citratus* DC., citral $\sim 75\%$, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland) were prepared using hexane (95%, Carlo Erba Reagenti, Arese, Italy) at 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 mg/ μ L. Tested solutions (10 μ L) were deposited on a strip of filter paper (20 \times 5 mm) placed in a glass Pasteur pipette. The solvent was allowed to evaporate for 15 min before first use. The tip of the pipette was connected to the metal tube, and the test stimulus was delivered to the antenna using an air pulse (20 mL/s for 0.6 s). Stimuli were released successively in random order at 90-s intervals to avoid receptor saturation. Octenol (1-octen-3-ol, 98%, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland) was used as a positive control and hexane was used as a negative control. Differences in EAG responses were evaluated using a Wilcoxon signed-rank test.

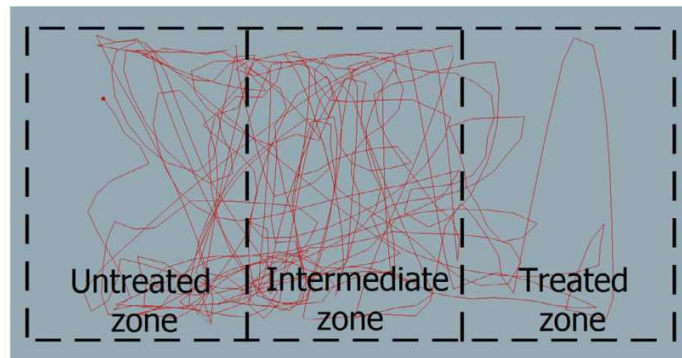


Figure 2. Track showing the 10-min recording of a stable fly in the bioassay cage divided into three zones: the untreated zone, the intermediate zone, and the treated zone.

Bioassays

To observe the flight behavior of stable flies, we used a screen cage (30 cm W × 15 cm H × 15 cm D) made of polyester mosquito netting suspended on a metal frame (Figure 1). A small hole in the middle of one side of the cage was sealed with a piece of cotton wool and was used to allow the release of one fly at a time into the cage. The cage was surrounded by a shield of white foam board to prevent optical stimulation of the flies. To stimulate the fly to move in the cage, pieces of blue and black fabric (SuperMaine 300 g cotton/polyester 65/35%; TDV industries, Laval, France), commonly used to attract biting flies, were hung on each side of the foam board [17, 24]. Illumination was provided by fluorescent tubes (frequency 50 Hz) placed below and above the screen cage. The light level in the middle of the cage was about 4600–5000 lux.

One fly was released into the cage 15 min before the test. Bioassays were conducted using male and female stable flies during the daytime at ambient laboratory temperatures of 22–26 °C and 40–50% relative humidity. The bioassays consisted of feeding-choice tests in which the fly had access to two blood sources, one of which was treated with lemongrass oil. Citrated bovine blood (1.5 mL), previously heated at 45 °C, was placed on two sanitary pads (Ø 4 cm) from which we removed the outer layer. The outer layer of one pad was impregnated with 100 µL of lemongrass oil solution at 0.1 mg/µL, and the other outer layer with 100 µL of hexane. When the solvent had evaporated, each outer layer was repositioned on top of one of the blood-soaked sanitary pads, which were placed just under the cage floor, 20 cm apart. Fly movement was recorded using a Digital Video Camera Recorder (DCR-SR21E; Sony, Japan) set 1 m above the center of the cage. The behavior of the fly was then recorded during a 10-min period. We tested 4–6 flies each day; the behavior of 24 flies was included in this study. The room was ventilated for at least 30 min between each test, and a new screen cage was used for successive flies. The positions of the pad treated with lemongrass oil and the untreated pad were inverted each time.

The cages were cleaned every day by soaking them in a 2% solution of Decon 90 (Decon Laboratories Limited, Sussex, England) for 12 h.

Video analysis

The video records of fly movement were analyzed using EthoVision XT (v. 8.0; Noldus Information Technology, Wageningen, the Netherlands) [28]. The cage was defined as an arena (30 × 15 cm) divided into three zones (each 10 × 15 cm): untreated, intermediate, and treated (Figure 1). Movement was recorded at 25 video frames per second, and the fly was tracked by dynamic subtraction (Figure 2). In this method, the program compares each sampled image with a reference image that is updated regularly. Image processing algorithms are applied to detect the fly against the background and to extract relevant image features. During data acquisition, EthoVision displays the live video image, tracking statistics (elapsed time, number of samples), and the *x*, *y* co-ordinates of the fly [28]. Several parameters were calculated: the distance moved (in centimeters), the total time spent in each zone (in seconds), the time spent in movement (in seconds), and the mean velocity (centimeters per second). “Moving” and “not moving” were defined with thresholds at 1 and 0.9 cm/s. A comparison between males and females was made with the non-parametric Mann-Whitney test for independent samples. Comparisons of flight parameters between the treated zone and the untreated zone were made with the non-parametric Wilcoxon signed-rank test for two samples of univariate data. All analyses were performed using PAST version 2.12 [12].

Lemongrass oil volatiles

To estimate the diffusion of lemongrass oil volatiles in the bioassay cage, we compared the atmospheric concentrations of

Table 1. Comparison of the flight activity of male and female stable flies (Mann-Whitney *U* test), and comparison of the behavior of flies (both sexes) between the zone treated with lemongrass oil and the untreated zone (Wilcoxon *W* signed-rank test).

	<i>N</i>	Median value	Percentiles	Test
Time spent in movement (s)				
Males	11	95.7	38.1–148.8	<i>U</i> = 34
Females	13	144.8	110.8–177	<i>p</i> = 0.030
Velocity (cm/s)				
Males	11	6.9	5.7–7.7	<i>U</i> = 10
Females	13	15	10.4–16.9	<i>p</i> = 0.0001
Total time (s)				
Treated zone	24	63.7	41–163.7	<i>W</i> = 233
Untreated zone	24	218.4	94.2–434.2	<i>p</i> = 0.016
Time spent in movement (s)				
Treated zone	24	22.3	11.3–35.8	<i>W</i> = 200
Untreated zone	24	30.6	14–54.3	<i>p</i> = 0.160
Velocity (cm/s)				
Treated zone	24	9.8	7.2–14	<i>W</i> = 182
Untreated zone	24	9.1	6.7–12.2	<i>p</i> = 0.371

Data that show significant differences are indicated in bold.

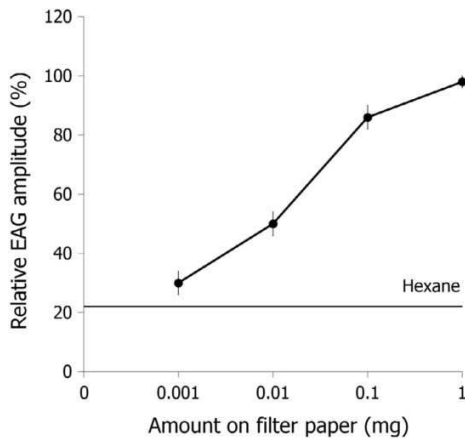


Figure 3. Mean relative EAG amplitudes recorded from *Stomoxys calcitrans* antennae (*n* = 7) stimulated with lemongrass essential oil at doses of 0.001 mg, 0.01 mg, 0.1 mg, and 1 mg. Hexane was used as negative control. EAG amplitudes are relative to the value of 100% for octenol at 1 mg in the stimulus syringe. Differences in EAG amplitudes were evaluated using the Wilcoxon signed-rank test. Significant differences are indicated by different letters (*p* ≤ 0.05).

neral and geranial, its most abundant constituents. To accomplish this, three 65 μm Polydimethylsiloxane-Divinylbenzene (PDMS-DVB) fibers (Supelco, Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA, USA) were conditioned in the inlet of a gas chromatograph (GC) held at 250 °C for 5 min before sampling. The SPME

holders were exposed in the cage for 10 min at three positions. One SPME fiber was positioned 10 cm above each of the two blood-soaked sanitary pads, and another was positioned in the middle of the cage. Relative concentrations of volatile samples were analyzed in a GC-mass spectrometry (MS; Shimadzu QP2010plus, Shimadzu Scientific Instruments, Kyoto, Japan), using helium as the carrier gas (1 mL/min). Samples were injected in splitless mode. The temperature program for GC analyses was 40 °C for 5 min, 5 °C/min to 220 °C, and 10 °C/min to 250 °C.

Results and discussion

Our investigation showed that *S. calcitrans* EAG amplitudes increased significantly in a dose-dependent fashion with increasing doses of lemongrass oil in the stimulus pipette. The mean EAG amplitude elicited by each dose (0.001 mg: 2.06 ± 0.37 mV; 0.01 mg: 3.37 ± 0.47 mV; 0.1 mg: 5.80 ± 0.67 mV; 1 mg: 6.50 ± 0.57 mV) was significantly greater than that elicited by hexane (1.46 ± 0.29 mV) (Figure 3) and there was no significant difference between lemongrass oil and the octenol at 1 mg on filter paper (6.64 ± 0.55 mV). Octenol is a very strong chemostimulant for *S. calcitrans* antennae [36, 41] and a good attractant in the field [11]. The study by Zhu *et al.* [44] was the first to report that stable fly antennae are also capable of detecting repellents such as catnip oil. In our study, EAG responses to lemongrass oil at 10 μg (~3350 μV) were nearly five times higher than the EAG responses to the same amount of catnip oil (~700 μV recorded by Zhu *et al.* [44]). These results indicate that lemongrass oil is a strong stimulant for the olfactory receptor cells of *S. calcitrans* and thus a suitable candidate for behavioral tests.

In the bioassays, the amount of lemongrass oil on the treated pad used in all tests was 10 mg. Relative concentrations of

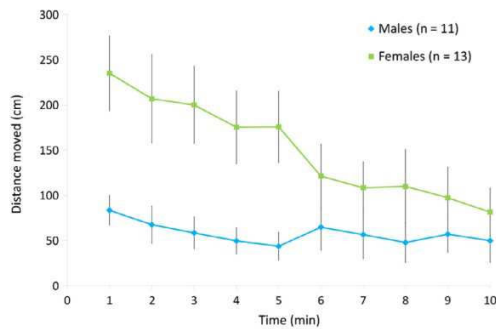


Figure 4. Time-course (mean \pm SE) of the distance moved by stable fly males and females for 10 min following release into a bioassay cage. Curves represent the distance moved for each successive 1-min period during 10-min recordings.

neral and geranial in the arena were assessed by the height of their peaks in mass chromatograms to reveal a 12-fold decrease in the atmospheric concentration of lemongrass oil between the treated and untreated pads. It should be noted, however, that this measurement was taken in the absence of a fly. The air flow induced by the flight activity of a fly in the cage might partially disturb this ratio during a test.

We tested 11 males and 13 females in the bioassay cage (Table 1). First, we compared the flight activity between the two sexes. The distance moved is considered to be the main indicator of the activity level of a fly [22]. At the beginning, females were more active than males (in terms of time spent in movement and velocity) (Figure 4). Over the duration of the 10-min recordings, the distance moved by females gradually decreased to reach a level similar to males. This decrease in movement might have been due to exposure to lemongrass oil, or simply to acclimation to the bioassay cage. This is an open question as no tests were conducted without a treated pad. However, locomotor activity was sexually distinct, as has been observed in fruit flies, *Drosophila melanogaster* [10].

Comparing the behavior of stable flies in the zone treated with lemongrass oil with their behavior in the untreated zone did not reveal any significant differences between the two zones in terms of the time spent in movement or in the mean velocity of movement (Table 1). However, stable flies spent significantly more time flying in the untreated zone than in the treated zone during the tests. Moreover, we observed nine stable flies feeding on the untreated pad, whereas none fed on the treated pad. The attractiveness of the untreated blood-soaked pad versus the treated pad explains the difference in the total time spent between the two zones. These findings suggest that lemongrass oil could be used as a repellent against stable flies. However, further investigations on spatial repellency and feeding

deterrence are necessary to demonstrate that lemongrass oil is as effective as catnip oil against stable flies in the field [44]. Video tracking appears to be a useful tool to study insect behavior in response to repellent volatiles [6, 33], especially for flies, which are otherwise difficult to track.

Acknowledgments. We would like to thank the École Nationale Vétérinaire (ENVT) of Toulouse for providing us with *S. calcitrans* pupae and CSIRO-CIRAD for access to their EthoVision XT system. We are very grateful to Bruno Buatois, CEFE-CNRS, for his technical assistance. All electroantennogram recordings and GCMS analyses were acquired at the CEFE-CNRS – Platform of Chemical Analysis in Ecology of the LabEx CeMEB, “Centre Méditerranéen de l’Environnement et de la Biodiversité”, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France.

References

- Bartlett C. 1985. An olfactometer for measuring the repellent effect of chemicals on the stable fly *Stomoxys calcitrans* (L). *Pesticide Science*, 16, 479–487.
- Chisowa EH, Hall DR, Farman DI. 1998. Volatile constituents of the essential oil of *Cymbopogon citratus* Stapf grown in Zambia. *Flavour and Fragrance Journal*, 13, 29–30.
- Cilek JE. 2003. Attraction of colored plasticized corrugated boards to adult stable flies, *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *Florida Entomologist*, 86, 420–423.
- Cilek JE, Greene GL. 1994. Stable flies (Diptera, Muscidae) insecticide resistance in Kansas cattle feedlots. *Journal of Economic Entomology*, 87, 275–279.
- Cilek JE, Hallmon CF, Johnson R. 2011. Efficacy of several commercially formulated essential oils against caged female *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* when operationally applied via an automatic-timed insecticide application system. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 27, 252–255.
- Cooperband MF, Allan SA. 2009. Effects of different pyrethroids on landing behavior of female *Aedes aegypti*, *Anopheles quadrimaculatus*, and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 46, 292–306.
- Desquesnes M, Bossard G, Patrel D, Herder S, Patout O, Lepetitcolin E, Thevenon S, Berthier D, Pavlovic D, Brugidou R, Jacquet P, Schelcher F, Faye B, Touratier L, Cuny G. 2008. First outbreak of *Trypanosoma evansi* in camels in metropolitan France. *Veterinary Record*, 162, 750–752.
- Dsouli Aymes N, Mavoungou JF, De Stordeur E, Duvallet G. 2009. Landscape, population structure and genetic diversity of *Stomoxys calcitrans*. *Parasite*, 16, 37–41.
- Foil LD, Hogsette JA. 1994. Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies. *Revue Scientifique et Technique*, 13, 1125–1158.
- Gatti S, Ferveur JF, Martin JR. 2000. Genetic identification of neurons controlling a sexually dimorphic behaviour. *Current Biology*, 10, 667–670.
- Gibson G, Torr SJ. 1999. Visual and olfactory responses of haematophagous Diptera to host stimuli. *Medical and Veterinary Entomology*, 13, 2–23.

12. Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia electronica*, 4, 2–9.
13. Hieu TT, Kim SI, Kwon HW, Ahn YJ. 2010. Enhanced repellency of binary mixtures of *Zanthoxylum piperitum* pericarp steam distillate or *Zanthoxylum armatum* seed oil constituents and *Calophyllum inophyllum* nut oil and their aerosols to *Stomoxys calcitrans*. *Pest Management Science*, 66, 1191–1198.
14. Jeanbourquin P, Guerin PM. 2007. Sensory and behavioural responses of the stable fly *Stomoxys calcitrans* to rumen volatiles. *Medical and Veterinary Entomology*, 21, 217–224.
15. Keawrayup S, Duvallet G, Sukonthabhirom S, Chareonviriyaphap T. 2012. Diversity of *Stomoxys* spp. (Diptera: Muscidae) and diurnal variations of activity of *Stomoxys indicus* and *S. calcitrans* in a farm, in Wang Nam Khiao District, Nakhon Ratchasima Province, Thailand. *Parasite*, 19, 259–265.
16. Kumar P, Mishra S, Malik A, Satya S. 2011. Repellent, larvicidal and pupicidal properties of essential oils and their formulations against the housefly, *Musca domestica*. *Medical and Veterinary Entomology*, 25, 302–310.
17. Laveissiere C, Grebaut P. 1990. Research on tsetse-fly traps (Diptera, Glossinidae) – Development of an economic model, the Vavoua trap. *Tropical Medicine and Parasitology*, 41, 185–192.
18. Leal WS, Uchida K. 1998. Application of GC-EAD to the determination of mosquito repellents derived from a plant, *Cymbopogon citratus*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 1, 217–221.
19. Liénard E, Salem A, Jacquet P, Grisez C, Prévot F, Blanchard B, Bouhsira E, Franc M. 2012. Development of a protocol testing the ability of *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) to transmit *Besnoitia besnoiti* (Henry, 1913) (Apicomplexa: Sarcocystidae). *Parasitology Research*, 112, 479–486.
20. Lopez-Sanchez J, Cruz-Vazquez C, Lezama-Gutierrez R, Ramos-Parra M. 2012. Effect of entomopathogenic fungi upon adults of *Stomoxys calcitrans* and *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Biocontrol Science and Technology*, 22, 969–973.
21. Marcon P, Thomas GD, Siegfried BD, Campbell JB. 1997. Susceptibility of stable flies (Diptera: Muscidae) from southeastern Nebraska beef cattle feedlots to selected insecticides and comparison of 3 bioassay techniques. *Journal of Economic Entomology*, 90, 293–298.
22. Martin JR. 2004. A portrait of locomotor behaviour in *Drosophila* determined by a video-tracking paradigm. *Behavioural Processes*, 67, 207–219.
23. Mavoungou JF, Jay-Robert P, Gilles J, Atsame Edda A, Duvallet G. 2008. Ecologie des stomoxes (Diptera : Muscidae) au Gabon. I-Premier inventaire dans différentes zones écologiques. *Parasite*, 15, 27–34.
24. Mihok S. 2002. The development of a multipurpose trap (the Nzi) for tsetse and other biting flies. *Bulletin of Entomological Research*, 92, 385–403.
25. Moore SJ, Darling ST, Sihuinchu M, Padilla N, Devine GJ. 2007. A low-cost repellent for malaria vectors in the Americas: results of two field trials in Guatemala and Peru. *Malaria Journal*, 6, 101.
26. Mullen GR, Durden LA. 2002. *Medical and veterinary entomology*. Amsterdam: Academic Press.
27. Mullens BA, Lii KS, Mao Y, Meyer JA, Peterson NG, Szijj CE. 2006. Behavioural responses of dairy cattle to the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, in an open field environment. *Medical and Veterinary Entomology*, 20, 122–137.
28. Noldus LPJJ, Spink AJ, Tegelenbosch RAJ. 2002. Computerised video tracking, movement analysis and behaviour recognition in insects. *Computers and Electronics in Agriculture*, 35, 201–227.
29. Oyedele AO, Gbolade AA, Sosan MB, Adewoyin FB, Soyelu OL, Orafidiya OO. 2002. Formulation of an effective mosquito-repellent topical product from lemongrass oil. *Phytomedicine*, 9, 259–262.
30. Phasomkusolsil S, Soonwera M. 2011. Comparative mosquito repellency of essential oils against *Aedes aegypti* (Linn.), *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison) and *Culex quinquefasciatus* (Say). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1, 113–118.
31. Pitzer JB, Kaufman PE, Tenbroeck SH. 2010. Assessing permethrin resistance in the stable fly (Diptera: Muscidae) in florida by using laboratory selections and field evaluations. *Journal of Economic Entomology*, 103, 2258–2263.
32. Revay EE, Junnila A, Xue RD, Kline DL, Bernier UR, Kravchenko VD, Qualls WA, Ghattas N, Müller GC. 2013. Evaluation of commercial products for personal protection against mosquitoes. *Acta Tropica*, 125, 226–230.
33. Rojht H, Kosir IJ, Trdan S. 2012. Chemical analysis of three herbal extracts and observation of their activity against adults of *Acanthoscelides obtectus* and *Leptinotarsa decemlineata* using a video tracking system. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 119, 59–67.
34. Salem A, Bouhsira E, Liénard E, Bousquet Melou A, Jacquet P, Franc M. 2012. Susceptibility of two European strains of *Stomoxys calcitrans* (L.) to cypermethrin, deltamethrin, fenvalerate, λ -cyalothrin, permethrin and phoxim. *Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 10, 249–257.
35. Salem A, Franc M, Jacquet P, Bouhsira E, Liénard E. 2012. Feeding and breeding aspects of *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) under laboratory conditions. *Parasite*, 19, 309–317.
36. Schofield S, Cork A, Brady J. 1995. Electroantennogram responses of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, to components of host odor. *Physiological Entomology*, 20, 273–280.
37. Sritabutra D, Soonwera M, Waltanachanobon S, Pongjai S. 2011. Evaluation of herbal essential oil as repellents against *Aedes aegypti* (L.) and *Anopheles dirus* Peyton & Harrison. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1, 124–128.
38. Stella Nerio L, Olivero-Verbel J, Stashenko E. 2010. Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology*, 101, 372–378.
39. Taylor DB, Moon RD, Mark DR. 2012. Economic impact of stable flies (Diptera: Muscidae) on dairy and beef cattle production. *Journal of Medical Entomology*, 49, 198–209.
40. Trigg JK, Hill N. 1996. Laboratory evaluation of a eucalyptus-based repellent against four biting arthropods. *Phytotherapy Research*, 10, 313–316.
41. Warnes ML, Finlayson LH. 1986. Electroantennogram responses of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, to carbon-dioxide and other odors. *Physiological Entomology*, 11, 469–473.
42. Zhu JJ, Berkebile DR, Dunlap CA, Zhang A, Boxler D, Tangtrakulwanich K, Behle RW, Baxendale F, Brewer G. 2012.

- Nepetalactones from essential oil of *Nepeta cataria* represent a stable fly feeding and oviposition repellent. *Medical and Veterinary Entomology*, 26, 131–138.
43. Zhu JJ, Zeng XP, Berkebile D, Du HJ, Tong Y, Qian K. 2009. Efficacy and safety of catnip (*Nepeta cataria*) as a novel filth fly repellent. *Medical and Veterinary Entomology*, 23, 209–216.
44. Zhu JWJ, Dunlap CA, Behle RW, Berkebile DR, Wienhold B. 2010. Repellency of a wax-based catnip-oil formulation against stable flies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 12320–12326.

Cite this article as: Baldacchino F, Tramut C, Salem A, Liénard E, Delétré E, Franc M, Martin T, Duvallet G & Jay-Robert P: The repellency of lemongrass oil against stable flies, tested using video tracking. *Parasite*, 2013, **20**, 21.



An international open-access, peer-reviewed, online journal publishing high quality papers on all aspects of human and animal parasitology

Reviews, articles and short notes may be submitted. Fields include, but are not limited to: general, medical and veterinary parasitology; morphology, including ultrastructure; parasite systematics, including entomology, acarology, helminthology and protistology, and molecular analyses; molecular biology and biochemistry; immunology of parasitic diseases; host-parasite relationships; ecology and life history of parasites; epidemiology; therapeutics; new diagnostic tools.

All papers in Parasite are published in English. Manuscripts should have a broad interest and must not have been published or submitted elsewhere. No limit is imposed on the length of manuscripts.

Parasite (open-access) continues **Parasite** (print and online editions, 1994-2012) and **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée** (1923-1993) and is the official journal of the Société Française de Parasitologie.

Editor-in-Chief:
Jean-Lou Justine, Paris

Submit your manuscript at
<http://parasite.edmgr.com/>