



**HAL**  
open science

# Caractérisation de l'entomofaune hématophage cavernicole du Gabon et implication dans la transmission d'agents infectieux

Judicaël Obame-Nkoghe

► **To cite this version:**

Judicaël Obame-Nkoghe. Caractérisation de l'entomofaune hématophage cavernicole du Gabon et implication dans la transmission d'agents infectieux. Microbiologie et Parasitologie. Université Montpellier, 2016. Français. NNT : 2016MONTT159 . tel-01686281

**HAL Id: tel-01686281**

**<https://theses.hal.science/tel-01686281>**

Submitted on 17 Jan 2018

**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 **Université de Montpellier**

Préparée au sein de l'école doctorale GAIA  
Et de l'unité de recherche MIVEGEC (IRD, France)/ESV  
(CIRMF, Gabon)

Spécialité : **Microbiologie-Parasitologie**

Présentée par **OBAME-NKOGHE Judicaël**

**Caractérisation de l'entomofaune  
hématophage cavernicole du Gabon et  
implication dans la transmission d'agents  
infectieux**

Soutenue le 13 Décembre 2016 devant le jury composé de

M. Gérard Duvallet, Professeur Emérite	Président du jury
M. Jérôme Depaquit, Professeur	Rapporteur
M. Oleg Mediannikov, Chargé de Recherche	Rapporteur
Mme. Anna Bella Failloux, Directeur de Recherche	Examineur
M. Vincent Robert, Directeur de recherche	Examineur
M. Thierry Baldet, Chargé de recherche	Membre invité
M. Nicolas Berthet, Chargé de Recherche	Membre invité
M. Christophe-Paupy, Chargé de Recherche	Directeur de thèse

# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
Docteur

Délivré par **Université de Montpellier**

Préparée au sein de l'école doctorale GAIA  
Et de l'unité de recherche MIVEGEC (IRD-CNRS-UM, France)/ESV  
(CIRMF, Gabon)

Spécialité : **Microbiologie-Parasitologie**

Présentée par **OBAME-NKOGHE Judicaël**

**Caractérisation de l'entomofaune  
hématophage cavernicole du Gabon et  
implication dans la transmission d'agents  
infectieux**

Soutenue le 13 Décembre 2016 devant le jury composé de

M. Gérard Duvallet, Professeur Emérite	Président du jury
M. Jérôme Depaquit, Professeur	Rapporteur
M. Oleg Mediannikov, Chargé de Recherche,	Rapporteur
Mme. Anna Bella Failloux, Directeur de Recherche	Examineur
M. Vincent Robert, Directeur de recherche	Examineur
M. Thierry Baldet, Chargé de recherche	Membre invité
M. Nicolas Berthet, Chargé de Recherche	Membre invité.
Christophe-Paupy, Chargé de Recherche	Directeur de thèse

## Remerciements

Je tiens à remercier le Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF), ainsi que l'unité d'Écologie des Systèmes Vectoriels (ESV) pour m'avoir accueilli et assuré de tout le soutien nécessaire, aussi bien matériel, financier et humain tout au long de cette thèse. Infiniment merci!

Je tiens à remercier l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) pour son accueil et son soutien financier à travers ses programmes de bourses aux doctorants. J'aimerais remercier très particulièrement l'unité Maladies Infectieuses et Vecteurs : Écologie, Génétique, Évolution et Contrôle (MIVEGEC) pour m'avoir accueilli et assuré d'un encadrement scientifique performant.

Je dis mon merci très sincère à toi, Dr. Christophe Paupy. Tu m'as fait confiance dès le début. Tu m'as appris les fondamentaux de la recherche. Merci pour l'opportunité que tu m'as donné d'embrasser la discipline de l'entomologie médicale et vétérinaire. Merci pour ton esprit critique et de rigueur affirmé. Merci pour ton engagement permanent, pour la motivation que tu n'as eu de cesse de me donner, même quand tout semblait insurmontable. Tu peux être fier de ce que je suis maintenant.

Merci à toi, Dr. Didier Fontenille. De t'avoir eu comme « Co-directeur de thèse » est pour moi un immense honneur. Merci pour tes conseils, pour ta pertinence scientifique, merci

*pour toute ton expérience et l'ouverture d'esprit que tu as su me communiquer. J'espère apprendre davantage de toi.*

*Merci à toi, Dr. Eric Leroy, Directeur du CIRMF. Je n'ai point de mots assez forts pour t'exprimer ma gratitude. Ces mots de remerciements à ton endroit ne seront peut-être jamais à la hauteur de la confiance que tu as toujours manifesté à mon endroit tout au long de ma thèse, et de ton engagement pour l'obtention des soutiens aussi bien logistiques que financiers.*

*Je dis sincèrement merci à vous tous qui m'avez soutenu de mille et une façons...*

*A toi, ma kotine, ma confidente privilégiée, mon soutien inconditionnel, ma source de motivation... Aucun mot ne saurait décrire ma reconnaissance à ton égard tout au long de ce parcours du combattant.*

*A toi, Dr. Diego Ayala, pour ton expertise technique précieuse, pour ton assistance et ton management formidable.*

*A toi, Dr. Nicolas Berthet, tu as été pour beaucoup dans la conduite à bien de cette thèse. Je ne te dirai jamais assez merci. Merci sincère pour ton engagement personnel dans ce projet. J'espère, de tous mes vœux, pouvoir donner suite à de futures collaborations.*

*A toi, Nil Rahola, pour avoir contribué solidement à mon apprentissage du métier. J'ai encore beaucoup à apprendre de toi. Merci pour ton assistance et ta disponibilité que je qualifierai de légendaire.*

A vous, Dr. Mathieu Bourgarel, Dr. Gaël Darren Maganga, Dr. Richard Oslisly pour vos expertises diverses et variées ainsi que vos apports multiformes dans ce projet. Je garde de chacun de vous beaucoup de leçons. Je sais que je n'ai pas encore fini d'apprendre de vous.

A vous, Mrs. Patrick Yangari du CIRMF, Phillipe Bousses de l'IRD et Xavier Allène du Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD). Je vous dis particulièrement merci pour avoir fondamentalement contribué à ma formation technique. Merci pour les beaux moments passés à vos côtés et pour l'amitié que vous m'avez à plusieurs reprises témoignée.

A toi, Dr. Illich Manfred Mombo, mon frère de toujours, je te dis merci pour ton soutien permanent et pour l'esprit d'entraide qui a toujours existé entre nous depuis nos débuts à l'université.

A toi, ma sœur, ma potesse, ma *kombi*, Axelle Sikoa (*Axou*), tu m'as été d'un grand soutien. Tu as toujours cru en moi contre vents et marrées.

A toi, Nancy Moukodoum (*Djoulay*), je ne peux pas t'oublier.

A toi, Heidi lancon, pour toute l'aide apportée.

A toi, Vanessa Brice, merci sincère pour ton soutien.

A toi, Pr. Jean-Bernard Lekana-Douki. Tu as toujours cru en moi. Tes peu de mots ont toujours suffi à booster mon mental. Merci !

A toi, Dr. Augustin Mouinga-Ondeme pour tes encouragements sans relâche.

A vous, Dr. Richard Oslisly, Dr. Stephan Ntie, M. Olier Testa et M. Serge Caillot pour les différentes collaborations réalisées. J'espère qu'il y en aura encore dans le futur.

A tous les membres de l'équipe ESV, Dr. Boris Makanga (*Le moine de la patrie, le patrimoine*), Dr. Paul-Yannick Bitome-Essono (*BT, PYB*), Dr. Billy Tene, Davy Jiolle, Julie Magnus, Ousmane Akone-Ella, Fabrice Menzeme, Marc-Flaubert Ngangue (*Mike*), Neil Michel Pendency, Vanessa Lambou-Fopa, Wilson Bahoun... Merci pour la bonne ambiance et l'esprit de collaboration. Peut-être qu'un jour j'aurai moi aussi des *plats chauds*.

A tous les étudiants stagiaires, ingénieurs, techniciens et le personnel du CIRMF et de l'IRD avec qui j'ai passé de très bons moments dans une ambiance conviviale.

A Mrs. Jérôme Depaquit, Oleg Mediannikov pour la spontanéité avec laquelle vous avez accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

A Mrs. Gérard Duvallet, Thierry Baldet, Vincent Robert, et Nicolas Berthet, et à Mme Anna-Bella Failloux pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être membres du jury de cette thèse.

Merci à vous tous et à vous toutes qui, bien que n'ayant pas été cité(e)s, avez contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.

Clin d'œil à vous, Mrs. Ray Gab et Bob Fort pour avoir toujours su être là à pic !

## Hommage

*A travers cette thèse, je rends un hommage unique et sans comparaison à toi, maman.  
Vois cette dernière comme une première récompense de tous tes sacrifices pour moi.*

*A toi, papa, je sais que tu es fier de moi de là où tu es.*

*A toi, tonton Claude, merci d'avoir été là pour moi.*

*A toute la famille Nguie-Obame Bikene Joseph...*

*...Cette thèse est aussi la vôtre.*



à Ethan

## Résumé

L’empreinte écologique de l’homme sur les milieux naturels forestiers d’Afrique centrale n’a cessé de s’accroître au cours des dernières décennies, et rares sont les écosystèmes qui ne sont pas exploités. Ainsi, même des milieux a priori hostiles comme les grottes constituent des ressources répondant aux besoins primaires des populations environnantes (chasse, pêche, lieu de culte), mais permettant également le développement d’activités économiques (exploitation minière et écotourisme). Cette anthropisation est susceptible d’augmenter l’exposition des populations humaines à une multitude d’agents infectieux circulant au sein de la faune cavernicole. La présence d’animaux sauvages ou domestiques dans l’environnement immédiat des grottes contribue également à augmenter un tel risque. Parmi ces agents infectieux, certains peuvent être transmis par contact direct avec le réservoir animal, d’autres peuvent nécessiter l’intervention d’insectes hématophages. Le rôle de ces insectes dans l’épidémiologie de nombreux pathogènes est bien connu en Afrique en milieux épigés, mais demeure largement sous-investigué dans les environnements cavernicoles. Dans ce travail de thèse, nous nous sommes proposés de répondre à cette problématique. Dans six grottes du Gabon nous avons entrepris une étude de la diversité des diptères hématophages, en réalisant un inventaire taxonomique et l’étude de la dynamique temporelle des assemblages d’espèces. Dans un second temps, nous avons entrepris un criblage moléculaire d’agents infectieux parasitaires, bactériens et viraux en ayant recours à des techniques de détection par PCR nichée et séquençage à haut débit.

Les travaux menés nous ont permis de réaliser un inventaire taxonomique de la faune diptérienne hématophage colonisant les grottes explorées. Notre étude a permis de découvrir une part importante de sa diversité de diptères hématophages cavernicoles, représentant plus de 60% des espèces de diptères (tous milieux confondus) actuellement au Gabon. Nos données ont montré que la composition des communautés de diptères variait d’une grotte à une autre, mais aussi au cours du temps en lien avec les variations microclimatiques des grottes. Le criblage d’agents infectieux chez les diptères collectés a permis 1) d’explorer la diversité parasitaire, virale et bactérienne qu’ils hébergent et 2) d’évaluer leur implication dans la transmission.

**Mots-clés** : Afrique Centrale, Gabon, Grottes, Arthropodes Vecteurs, Agents infectieux, Chauves-souris

## Characterization of the hematophagous entomological fauna from caves in Gabon and their involvement in the transmission of infectious agents

### Summary

Man's ecological mark on natural forest environments of Central Africa has been increasing in recent decades, and only few natural areas remain non-exploited yet. Thus, even supposedly hostile environments such as caves meet the primary needs (hunting, fishing, shamanic practices) or economical needs (mining and ecotourism) of surrounding populations. This anthropization is likely to increase the exposure of human populations to multiple infectious agents carried by cave fauna. The presence of wild or domestic animals in the surroundings of caves also increases that risk. Among these infectious agents, some can be transmitted by direct contact with animal reservoirs, whereas others may require the involvement of blood-sucking insects. The role of these insects in the epidemiology of many pathogens is well known in Africa, particularly in epigeic environments, but remains largely under-investigated in caves. In this thesis work, we proposed to address this issue. First, we explored the diversity of blood-sucking Diptera in six caves in Gabon and we studied the temporal dynamics of the assemblage of species. Secondly, we undertook a molecular screening of haemosporidia, bacteria and viruses using nested PCR and high-throughput sequencing.

The work carried out enabled us to create a taxonomic inventory of the Diptera fauna of the investigated caves. Our study revealed a significant diversity of the blood-sucking Diptera fauna, accounting for more than 60 percent of blood-sucking Diptera species currently known in Gabon, in all types of areas. Our data showed that the composition of Diptera communities was different from one cave to another, and that Diptera assemblages varied over time according to micro-climate fluctuations within caves. The screening of infectious agents in the collected Diptera helped 1) to explore the parasitic, viral and bacterial diversity they host, and 2) to assess their involvement in transmission.

**Keywords:** Central Africa, Gabon, Vector arthropods, Infectious agents, Bats

## Intitulés et adresses des laboratoires où a été effectuée la thèse

Cette thèse a été effectuée dans les laboratoires suivants :

- Écologie des Systèmes Vectoriels (ESV), Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF). BP : 769, Franceville (Gabon)



- Maladies Infectieuses et Vecteurs : Écologie Génétique, Évolution et Contrôle (MIVEGEC, unité mixte de recherche IRD-CNRS-UM), Centre IRD de Montpellier,  
911, Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France





# TABLE DES MATIÈRES

<b>Résumé</b> .....	1
<b>Liste des abréviations</b> .....	9
<b>Liste des tableaux</b> .....	11
<b>Liste des figures</b> .....	12
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b> .....	16
<b><u>PARTIE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</u></b>	
<b>Chapitre 1. Éléments de biospéléologie</b> .....	22
1.1. Définition et historique.....	23
1.2. Typologie physique des grottes dans le monde.....	26
1.2.1. Grottes à roches solubles.....	27
1.2.2. Grottes à roches non solubles.....	28
1.3. Caractéristiques des écosystèmes cavernicoles.....	29
1.3.1. Le biotope.....	29
1.3.2. La faune cavernicole.....	30
<b>Chapitre 2. Insectes hématophages cavernicoles afrotropicaux et transmission d'agents infectieux</b> .....	34
2.1. Généralités.....	35
2.2. Diptères hématophages cavernicoles d'Afrique tropicale.....	38
2.2.1. Culicidae.....	38
2.2.1.1. Morphologie générale et rappels de systématique.....	38
2.2.1.2. Cycle biologique et écologie.....	40
2.2.1.3. Les Culicidae des grottes d'Afrique tropicale.....	42

2.2.1.4. Implication dans la transmission d'agents infectieux.....	42
2.2.2. Phlebotominae.....	45
2.2.2.1. Morphologie générale et rappels de systématique.....	45
2.2.2.2. Cycle biologique et écologie.....	46
2.2.2.3. Les Phlebotominae des grottes d'Afrique tropicale.....	47
2.2.2.4. Implication dans la transmission d'agents infectieux.....	49
2.2.3. Ceratopogonidae.....	50
2.2.3.1. Morphologie générale et rappels de systématique.....	50
2.2.3.2. Cycle biologique et écologie.....	52
2.2.3.3. Les Ceratopogonidae des grottes d'Afrique tropicale.....	53
2.2.3.4. Implication dans la transmission d'agents infectieux.....	53
2.2.4. Ectoparasites de chauves-souris : Nycteribiidae et Streblidae.....	55
2.2.4.1. Morphologie générale.....	55
2.2.4.2. Position taxonomique.....	57
2.2.4.3. Cycle biologique et écologie.....	58
2.2.4.4. Les Nycteribiidae et Streblidae des grottes d'Afrique.....	60
2.2.4.5. Implication dans la transmission d'agents infectieux.....	60
2.3. Autres arthropodes hématophages cavernicoles.....	61
2.3.1. Les puces.....	62
2.3.2. Les punaises.....	63
2.3.3. Les tiques.....	66
2.4. Connaissances actuelles sur l'entomofaune hématophage cavernicole du Gabon.....	67
2.3.1. Les grottes du Gabon.....	67
2.3.2. État des lieux des recherches sur la faune entomologique cavernicole.....	70
<b>Chapitre 3. Défis futurs et objectifs.....</b>	<b>72</b>
3.1. Le phénomène de l'émergence zoonotique et ses causes.....	73
3.2. Les chauves-souris : réservoirs privilégiés des milieux hypogés.....	75
3.3. Défis en cours et futures orientations.....	76
3.4. Objectifs spécifiques.....	78

## **PARTIE 2 : MÉMOIRE EXPÉRIMENTAL**

---

<b>Chapitre 4. Outils méthodologiques.....</b>	<b>101</b>
4.1. Présentation des sites d'étude.....	102

4.1.1. Les grottes de la forêt de Bélinga.....	102
4.1.1.1. Grotte du Faucon.....	103
4.1.1.2. Grotte de Zadié.....	104
4.1.2. Grotte de Kessipoughou.....	105
4.1.3. Grottes de Siyou et Itsoulou.....	106
4.1.4. Grotte de Djibilong.....	108
4.2. Stratégie d'échantillonnage et identifications taxonomiques.....	110
4.2.1. Collecte des diptères libres : Culicidae, Phlebotominae et Ceratopogonidae.....	110
4.2.2. Collecte des diptères ectoparasites : Nycteribiidae et Streblidae.....	113
4.3. Analyses des communautés, tests statistiques.....	114
4.4. Criblage d'agents infectieux.....	117
4.4.1. Criblage de parasites hémospories.....	117
4.4.2. Criblage viral et bactérien.....	119

## **Chapitre 5. Exploration de la diversité des diptères hématophages**

<b>libres des grottes du Gabon.....</b>	<b>125</b>
5.1. Contexte.....	126
5.2. Procédure expérimentale.....	127
5.3. Résultats.....	127
5.4. Conclusions.....;	130

## **Chapitre 6. Diversité des diptères hématophages ectoparasites de chauves-souris**

<b>cavernicoles du Gabon et implication dans la transmission d'hémospories.....</b>	<b>158</b>
6.1. Contexte.....	159
6.2. Procédure expérimentale.....	160
6.3. Résultats.....	160
6.4. Conclusions.....;	162

## **Chapitre 7. Étude des communautés virales et bactériennes des diptères hématophages**

<b>cavernicoles du Gabon : implication dans la transmission.....</b>	<b>181</b>
7.1. Contexte et objectifs.....	182
7.2. Approche méthodologique.....	183
7.3. Résultats.....	183
7.4. Discussion.....;	197



<b>Chapitre 8. Discussion générale</b> .....	212
8.1. Peuplement cavernicole des diptères hématophages libres du Gabon.....	213
8.2. Peuplement cavernicole des diptères ectoparasites de chauves-souris du Gabon et implication dans la transmission de <i>Polychromophilus melanipherus</i> .....	218
8.3. Diversité virale et bactérienne des diptères hématophages cavernicoles du Gabon : implication dans la transmission.....	221
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES</b> .....	226
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	230
<b>ANNEXES</b> .....	247

## Liste des abréviations

A : Abondance des insectes collectés

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AIC : Akaike Information Criterion

ANOVA : *Analysis of variance*

ARN : Acide RiboNucléique

BLAST : *Basic Local Alignment Search Tool*

BWA : *Burrows-Wheeler Aligner*

C : Indice de similarité de Morisita-Horn

CDC : Center for Disease Control

*d* : Indice de dominance

DA : Densité Apparente

ddl : degré de liberté

EDGE : *Empoweing the Development of Genomics Expertise*

GLM : *Generalized Linear Model*

GLMM : *Generalized Linear Mixed Models*

GPS : *Global Positioning System*

ML : *Maximum Likelihood*

MLE-IR : *Maximum Likelihood Estimates of Infection Rate*

NGS : *Next Generation Sequencing*

NCBI : *National Center for Biotechnology Information*

H : Indice de Shannon

PBS : *Phosphate Buffered salin*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

## Liste des abréviations

---

*S* : Richesse spécifique

RIN : *RNA Integrity Number*

TBE : Tris Borate Ethylène Diamine Tetra Acétone

## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Les Culicidae cavernicoles connus d'Afrique tropicale.....	<b>43</b>
<b>Tableau II</b> : Virus isolés de chauves souris en Afrique.....	<b>77</b>
<b>Tableau III</b> : Nombre de lot par espèces de diptères analysés.....	<b>185</b>
<b>Tableau IV</b> : Virus détectés à une profondeur de séquençage de 5 millions de reads chez les diptères des grottes de Kessipoughou et Djibilong.....	<b>187</b>
<b>Tableau V</b> : Nombre de bases assignées aux virus détectés dans les échantillons 1 et 2 avec des profondeurs de séquençage de 5 millions et 200 millions de reads.....	<b>188</b>
<b>Table VI</b> : Classes bactériennes identifiées chez l'ensemble des diptères cavernicoles étudiés.....	<b>189</b>
<b>Tableau VII</b> : Principaux genres bactériens détectés chez les diptères cavernicoles criblés.....	<b>196</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Un protée ( <i>Proteus anguinus</i> ).....	<b>23</b>
<b>Figure 2</b> : Photographie de Emile Georges Racovitza .....	<b>25</b>
<b>Figure 3</b> : Photographie de René Jeannel par P. Nadar (1932).....	<b>25</b>
<b>Figure 4</b> : Répartition des régions explorées dans le monde avant 1900.....	<b>26</b>
<b>Figure 5</b> : Exemples de grottes à roches solubles.....	<b>27</b>
<b>Figure 6</b> : Exemples de grottes à roches non solubles.....	<b>28</b>
<b>Figure 7</b> : <i>Leptodirus hohenwartii</i> .....	<b>32</b>
<b>Figure 8</b> : Morphologie générale d'un insecte.....	<b>36</b>
<b>Figure 9</b> : Classification des arthropodes.....	<b>37</b>
<b>Figure 10</b> : Morphologie générale d'un moustique adulte.....	<b>38</b>
<b>Figure 11</b> : Cycle de reproduction des moustiques.....	<b>40</b>
<b>Figure 12</b> : Phlébotome : stades évolutifs et morphologie de l'adulte.....	<b>46</b>
<b>Figure 13</b> : Cycle biologique des phlébotomes.....	<b>47</b>
<b>Figure 14</b> : Ceratopogonidae : stades évolutifs et morphologie de l'adulte.....	<b>51</b>
<b>Figure 15</b> : Cycle biologique de Ceratopogonidae.....	<b>52</b>
<b>Figure 16</b> : Morphologie des Nycteribiidae et Streblidae .....	<b>56</b>
<b>Figure 17</b> : Cycle de reproduction des Nycteribiidae et Streblidae.....	<b>59</b>
<b>Figure 18</b> : Photo Siphonaptère (puce).....	<b>63</b>

<b>Figure 19</b> : Hétéroptères (réduve et punaise).....	<b>64</b>
<b>Figure 20</b> : Distribution des grottes actuellement recensées au Gabon.....	<b>69</b>
<b>Figure 21</b> : Localisation des grottes investiguées.....	<b>103</b>
<b>Figure 22</b> : Grotte du Faucon (vue de l'entrée).....	<b>104</b>
<b>Figure 23</b> : Grotte de Zadié (vue de l'entrée).....	<b>106</b>
<b>Figure 24</b> : Grotte de Kessipoughou.....	<b>108</b>
<b>Figure 25</b> : Grotte de Siyou.....	<b>109</b>
<b>Figure 26</b> : Grotte de Djibilong.....	<b>110</b>
<b>Figure 27</b> : Capture des diptères libres au piège lumineux de type CDC.....	<b>111</b>
<b>Figure 28</b> : Laboratoire de terrain.....	<b>112</b>
<b>Figure 29</b> : Piège harpe dressé.....	<b>114</b>
<b>Figure 30</b> : Outils de broyage du matériel biologique.....	<b>118</b>
<b>Figure 31</b> : Processus de synthèse des bibliothèques par le protocole <i>NEBNext</i> .....	<b>122</b>
<b>Figure 32</b> : Pipeline METATAX.....	<b>124</b>
<b>Figure 33</b> : Scores de qualité des reads générés à la profondeur de 5 millions de reads.....	<b>184</b>
<b>Figure 34</b> : Familles virales détectées sur l'ensemble des lots criblés.....	<b>186</b>
<b>Figure 35</b> : Distribution des reads d'Alphaproteobacteria détectés chez les diptères analysés.....	<b>192</b>

<b>Figure 36</b> : Distribution des reads des Gammaproteobacteria détectés chez les diptères analysés.....	<b>193</b>
<b>Figure 37</b> : Distribution des reads des Betaproteobacteria, Spirochaetes, Tenericutes et Bacilli détectés chez les diptères analysés.....	<b>194</b>





# **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

### INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'histoire de l'humanité est étroitement liée à l'usage des grottes. Ainsi, au paléolithique alors même qu'ils adoptaient un mode de vie de chasseurs cueilleurs et qu'émergeaient les premières formes de croyances, les hommes les utilisaient comme abris pour faire face aux aléas climatiques, ou encore pour divers cultes à caractère chamaniques (Carrau, 1876; Chavaillon, 2000). C'est le cas par exemple de l'espèce *Homo naledi*, récemment découverte dans les réseaux karstiques de *Rising Star* en Afrique du Sud et pour qui les grottes constituaient des lieux pour la tenue de rituels funéraires (Berger et al., 2015). D'autres études paléontologiques menées dans divers pays d'Europe ont révélé l'existence de gravures et fresques rupestres témoignant de l'occupation des grottes par l'homme depuis les temps préhistoriques (Abadia and Gonzalez Morales, 2013; Valladas et al., 2001). Depuis lors elles constituent, à travers le monde, un enjeu considérable pour les populations humaines environnantes pour l'exploitation de diverses ressources à l'instar de l'eau, de poissons et de gibiers, mais aussi pour la pratique de divers cultes et croyances ancestrales. Par ailleurs, l'anthropisation contemporaine des grottes est croissante, et cela, en lien avec le développement d'activités économiques dans le secteur minier et celui de l'écotourisme.

Au-delà de leur utilisation par l'homme, les grottes représentent également des refuges pour de nombreuses formes de vie, de microorganismes à des vertébrés caractérisés par la présence d'adaptations singulières. La richesse animale, tant sur un plan qualitatif que quantitatif, favorise une importante circulation d'agents infectieux, dont un grand nombre présente un fort potentiel zoonotique (Jurado et al., 2010). Ainsi l'anthropisation grandissante des grottes génère un risque de transfert d'agents infectieux vers l'homme et l'émergence de problèmes majeurs de santé publique (Cascio et al., 2011). Le concept de zoonose implique la circulation d'un agent infectieux chez un animal « réservoir », un passage chez l'homme, soit par contact direct (griffure, morsure, contact avec des fluides corporels, consommation) ou indirect (par exemple par l'intermédiaire d'un arthropode hématophage vecteur).

Parmi les animaux vivant dans les grottes, les vertébrés constituent des réservoirs privilégiés d'agents infectieux zoonotiques parasitaires, bactériens et surtout viraux, dont Marburg figure parmi les plus connus (Jurado et al., 2010; Maganga et al., 2011). Ces vertébrés (généralement des mammifères et des

oiseaux) sont très souvent des visiteurs occasionnels ou des cavernicoles semi-permanents, c'est-à-dire pouvant vivre dans les grottes durant des périodes plus ou moins prolongées, souvent au rythme des saisons. Parmi eux nous pouvons citer les chauves-souris et les rongeurs, suivis de certaines espèces d'oiseaux, qui sont de loin les plus abondants et les plus largement distribués à travers le monde (Tvrtkovic, 2012). D'autres vertébrés, sont également occasionnellement rencontrés dans les grottes (ours, renards, blaireaux, etc.) mais de manière plus localisée dans des grottes des régions tempérées qu'ils utilisent à des fins d'hibernation. En Afrique, divers vertébrés comme des porcs-épics, panthères ou reptiles fréquentent également les grottes. En revanche peu d'entre eux sont des cavernicoles exclusifs mis à part certaines espèces de reptiles, poissons et amphibiens particulièrement bien adaptées (Pernet, 2012).

Parmi les arthropodes cavernicoles, il existe une importante diversité de diptères hématophages piquant des vertébrés cavernicoles. Ainsi, de par leur caractère hématophage, ces insectes contribuent au maintien et à la circulation d'agents infectieux en assurant leur transmission. Ces insectes, pour la plupart des représentants des familles des Culicidae Meigen, Psychodidae Bigot, Cimicidae Latreille, Ceratopogonidae Grassi et des ectoparasites de mammifères (en particulier les familles des Nycteribiidae Samouelle, Streblidae Kolenati, Hystrichopsyllidae Hopkins and Rothschild, Ischnopsyllidae Wahlgren et Pulicidae Billberg), sont connus de grottes dans différentes régions du monde et notamment dans les régions néarctique, paléarctique, orientale, australienne et afrotropicale (Matile, 1994).

Avec l'augmentation du contact homme-grotte, il est important de développer nos connaissances sur les communautés de diptères capables d'entretenir la circulation d'agents infectieux dans les grottes et ceux pouvant assurer des transferts vers l'homme. Les moustiques, phlébotomes et cératopogonides, qui sont des groupes reconnus pour leur importance en santé humaine (Abonnenc, 1972; Cornet, 1981; Rodhain and Perez, 1985), paraissent particulièrement dangereux en ce sens.

Par le passé, la faune des écosystèmes cavernicoles d'Europe et d'Amérique du Nord a reçu davantage d'attention que celle des régions tropicales (Howarth, 1983). En Afrique, et particulièrement au Gabon, les environnements cavernicoles sont caractérisés par une importante faune de micromammifères (en particulier les chiroptères) impliqués dans le maintien d'agents infectieux potentiellement

zoonotiques (Duval et al., 2012; Maganga et al., 2011; Maganga et al., 2014a), dont certains nécessitent l'intervention de diptères hématophages pour assurer leur circulation dans la nature. Cependant ces cycles de transmission demeurent encore mal caractérisés, en grande partie du fait notamment d'un déficit de connaissances des espèces vectrices et de leur bioécologie.

Des travaux portant sur la circulation d'agents infectieux dans les grottes du Gabon, ont été entreprises au cours des dernières années par les équipes du Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF, Gabon). Ils sont réalisés dans le but d'étudier l'épidémiologie des zoonoses émergentes en lien avec les milieux cavernicoles et d'évaluer leur risque pour la santé humaine. Ils comprennent des volets parasitologique, virologique, écologique et entomologique visant à répondre à des questions de recherche globales et intégratives autour de ces environnements. Les premières investigations ont permis de découvrir, parmi les chauves-souris colonisant ces milieux cavernicoles, des réservoirs de virus à fort potentiel zoonotique tels que le virus Marburg (Maganga et al., 2011) et des parasites hémospories (Duval et al., 2012). Ces volets de recherche impliquent l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD, France) par des outils collaboratifs tels que le Programme Pilote Régional Changements Globaux, Biodiversité et Santé dans les Forêts Tropicales Humides d'Afrique Centrale (PPR-FTH-AC), dont l'un des axes de recherche intègre la problématique des risques infectieux dans les cavités du Gabon. Le travail entrepris dans cette thèse établit des connexions entre les axes de recherche développés par ces deux institutions et se positionne comme une contribution en réponse aux objectifs globaux de leurs « politiques scientifiques ». C'est donc dans ce contexte que s'inscrit ce travail, initié dans six cavités à travers le pays (Faucon, Zadié, Siyou, Itsolou, Kessipoughou et Djibilong), qui a pour **objectif général de caractériser la faune entomologique hématophage des grottes et d'évaluer son implication dans la transmission d'agents infectieux.**



# **PARTIE 1**

---

## **SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

## Chapitre 1

# Éléments de biospéléologie

*Ce chapitre est une introduction à la biospéléologie. Il présente dans un premier temps les fondements historiques de la biospéléologie moderne ainsi que les premières découvertes liées à cette discipline. Dans un second temps, le chapitre fournit des éléments relatifs à la typologie physique et aux processus de formation des grottes à travers le monde, à différents éléments bio-écologiques caractéristiques des écosystèmes cavernicoles (le biotope et les caractéristiques physiques et physiologiques des animaux qui y vivent).*

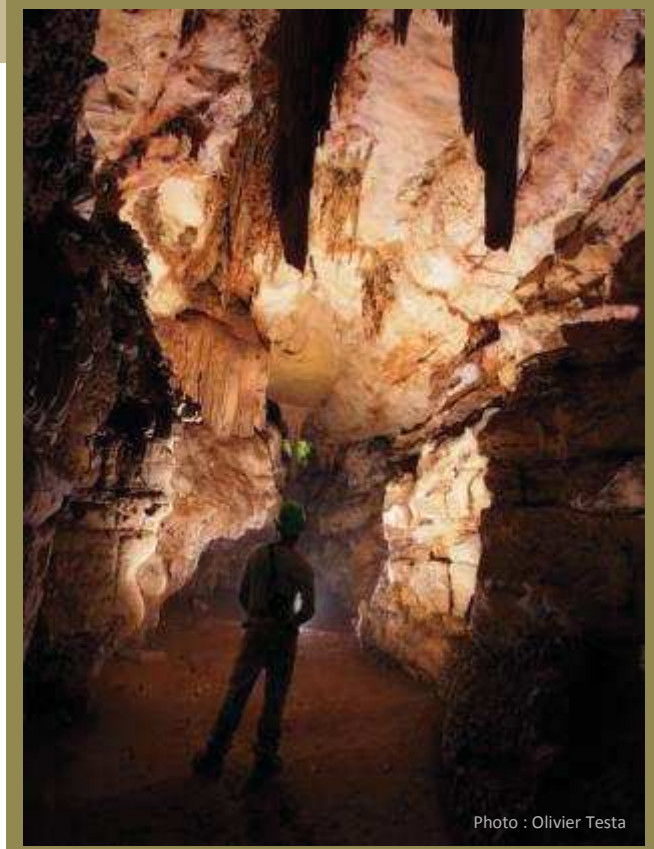


Photo : Olivier Testa

## 1.1. Définition et historique

La biospéléologie s'intéresse aux êtres vivants colonisant les milieux hypogés (c'est-à-dire souterrains) terrestres ou aquatiques, communément appelés « grottes ». Elle comprend plusieurs domaines disciplinaires, parmi lesquels la biologie, l'écologie, l'anatomie, l'évolution, la physiologie, la génétique, la taxonomie et la systématique. D'un point de vue fondamental, il est très intéressant d'étudier les animaux cavernicoles au regard des conditions environnementales atypiques et extrêmes auxquelles ils sont soumis au sein des grottes.

Il y a 15 000 ans, l'homme représentait déjà des animaux cavernicoles, comme l'atteste la gravure d'une sauterelle cavernicole du genre *Troglophilus* réalisée sur un os de bison (Stefanato, 2015). Cependant la biospéléologie comme discipline scientifique doit sa première découverte à Johan Weichard Von Valsavor en 1689, qui fit la première description d'un vertébré cavernicole, celle du protée (*Proteus anguinus*, Figure 1) dans la grotte de la Carniole en ex-Yougoslavie, (Stefanato, 2015).



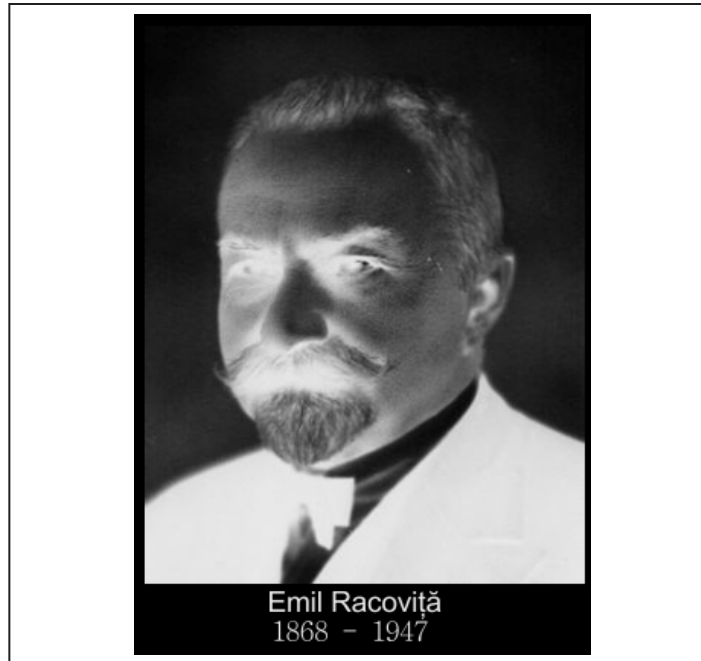
**Figure 1** : Un protée (*Proteus anguinus*)

Un demi-siècle plus tard, Josephus Nicolaus Laurenti conduira une étude de systématique détaillée de ce batracien urodèle (Juberthie, 2005). De nombreuses découvertes seront faites par la suite entre 1770 et 1850 à travers plusieurs pays

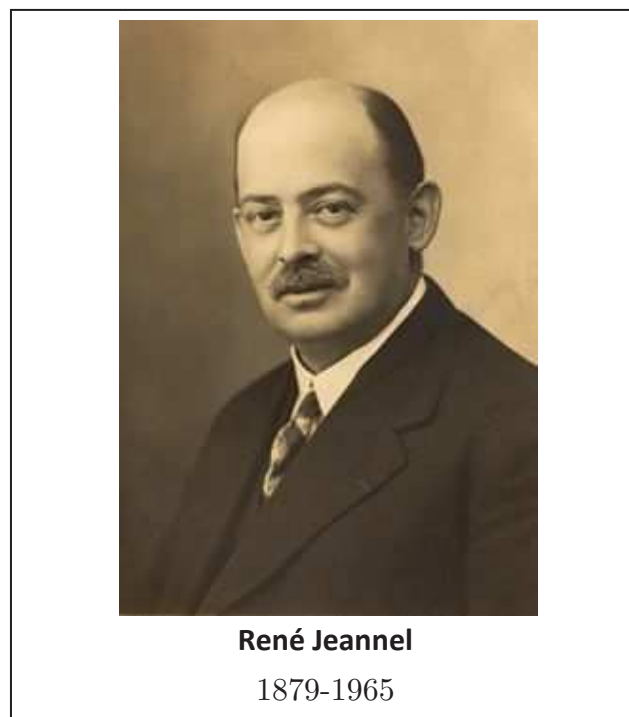


d'Europe (Italie, République Tchèque, Autriche, Bulgarie, Hongrie, France, Allemagne, Espagne...) ou d'Amérique (États Unis d'Amérique, Venezuela) et contribueront considérablement à une avancée des connaissances dans ce champs disciplinaire. Parmi ces découvertes citons la description en 1776 de *Dolichopoda palpata*, un orthoptère cavernicole, par Johann Heinrich Sulzer en Italie ; la description d'un ver capturé en 1781 par Jean Meyer et décrit comme *Trichodilus pragensis* par Franz Vejdovsky ; l'exhumation et l'étude, en 1831 par Luka Cec et Ferdinand Schmidt d'un fossile de coléoptère, *Leptodirus hohenwartii*, dans la grotte de Postumia en Sloveie (Juberthie, 2005) ; la description par Vinzenz Kollar en 1833 de la sauterelle *Troglophilus cavicola* ; et la description en 1842 d'un poisson cavernicole, *Amblyopsis spelaea* dans les eaux souterraines des grottes du Kentucky (États Unis d'Amérique) par James De Kay (Juberthie, 2005). Cependant les premières découvertes réalisées en France dans des grottes des Pyrénées dès 1857, vont fortement stimuler la communauté scientifique. Ainsi l'association internationale « *Biospeologica* » sera fondée en 1907 par Emile Georges Racovitza (Figure 2) et son principal collaborateur René Jeannel (Figure 3). Cette association aura pour centres de référence le laboratoire Arago à Banyuls-sur-Mer (France), le laboratoire de l'Institut de Spéléologie de Cluj (Roumanie, également crée par Racovitza) et le laboratoire du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris (France) animé par Jeannel, et qui sera transféré plus tard dans les catacombes du Jardin des Plantes (Corson and Ourdy, 1962). Jusqu'à la fin du XIXème siècle, plusieurs expéditions seront menées en milieux souterrains dans plus d'une vingtaine de pays à travers le monde (Europe, Proche Orient, Pacifique, sur les continents américains et africains) (Figure 4). Si cette période est marquée par diverses approches, toutes différentes les unes des autres, la biospéléologie moderne naîtra dès le début du XXème siècle toujours avec Racovitza et Jeannel. Suite à l'expédition « *Belgica* » menée en Antarctique,

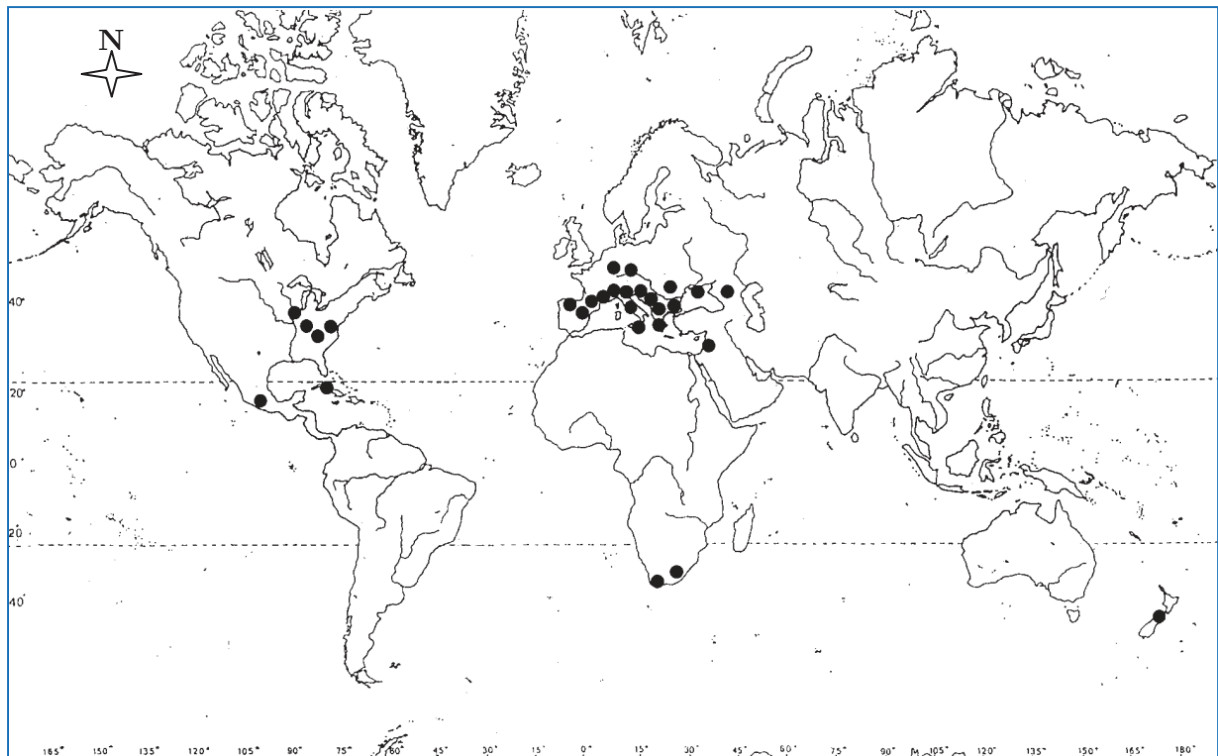
l'exploration d'une grotte de l'île de Majorque (*la Cueva del drach*) et plusieurs analyses critiques de nombreux travaux antérieurs, ces derniers prendront conscience



**Figure 2** : Photographie de Emile Georges Racovitza  
(*Institut de speleologie "Emil Racoviță"*)



**Figure 3** : Photographie de René Jeannel par P. Nadar (1932)



**Figure 4** : Répartition des régions explorées dans le monde avant 1900. En points noirs sont représentées les localisations des principales expéditions biospéléologiques menées au XIX<sup>ème</sup> siècle.

de la nécessité de considérer les milieux souterrains comme de véritables « laboratoires de l'évolution » et d'établir les fondements de la biospéléologie moderne. L'ensemble des réflexions de Racovitza seront regroupées dans son *essai sur les problèmes biospéléologiques* (Racovitza, 1907) qui reste considéré comme le texte scientifique fondateur de la biospéléologie contemporaine.

## 1.2. Typologie physique des grottes dans le monde

De la nature physique de la roche, des caractéristiques chimiques des eaux d'infiltration et des conditions climatiques va résulter une grande diversité de grottes. Parmi les éléments naturels capables d'altérer les roches, l'eau occupe sans doute la place la plus importante dans le processus de formation des cavités. C'est la raison

pour laquelle, en fonction de la nature des roches, on distingue les grottes à roches solubles et les grottes à roches non solubles.

### 1.2.1. Grottes à roches solubles

Les grottes à roches solubles sont le plus souvent formées dans les régions dites « karstiques ». Les karsts sont des formations rocheuses, très souvent à dominante calcaire, caractérisées par des phénomènes de dissolution intense sous l'influence de l'eau à travers l'érosion hydrochimique et hydraulique. Divers types de roches solubles existent (Figure 5). Les principales sont :

- Les roches dites « très solubles », composées généralement d'évaporites (constituées de minéraux tels que le gypse, l'anhydrite et la halite), c'est-à-dire de dépôts sédimentaires dont l'érosion est très intense, et qui peut conduire à des effondrements rapides des grottes, voire jusqu'à la disparition complète de la roche sous l'action de l'eau (Lignier, 2008).

- Les roches dites « peu solubles », qui sont généralement formées de roches dominées par du quartz (silice). Les grottes formées de quartzites sont relativement rares, lentes à l'érosion, rendant leur processus de formation très lent. (Lignier, 2008).



**Figure 5** : Exemples de grottes à roches solubles

- Les roches dites « moyennement solubles », qui sont moins solubles que les évaporites mais plus solubles que les quartzites. Elles sont à l'origine de nombreuses grottes formées à travers le monde. Elles sont généralement constituées de roches

carbonatées, essentiellement calcaires et dolomitiques, qui permettent une karstification intense et pérenne (Lignier, 2008).

### 1.2.2. Grottes à roches non solubles

Bien que la plupart des grottes prennent naissance dans les roches solubles et perméables des environnements karstiques, celles-ci peuvent plus rarement se former dans des roches imperméables « non solubles ». C'est le cas des grottes formées dans les roches granitiques ou basaltiques (Figure 6).

- Les roches granitiques, dont les cavités, généralement peu profondes, se creusent à partir de diaclases béantes, ou sous l'effet de l'altération du granite en surface, transformant les feldspaths et les micas en argiles sableux (Lignier, 2008).

- Les roches basaltiques, peuvent être à l'origine de très larges cavités. Ces dernières constituent de longs tunnels formés à la suite de coulées de lave basaltique très chaude avoisinant les 1200°C, dont la surface se refroidit et se solidifie rapidement au contact de l'air tandis que la coulée se poursuit à l'intérieur, formant ainsi plusieurs galeries (Swanson, 1973).



**Figure 6** : Exemples de grottes à roches non solubles

En dehors des grottes à roches d'origine volcanique, d'autres types de grottes, peuvent s'ajouter à cette liste comme les grottes formées dans les glaciers (régions tempérées et boréales) dont la formation est rendu possible par l'infiltration d'eau

lors de la fonte des glaciers ; et les grottes, beaucoup plus rares, formées de roches latéritiques.

### **1.3. Caractéristiques des écosystèmes cavernicoles**

#### **1.3.1. Le biotope**

Un écosystème se définit comme un ensemble d'êtres vivants, animaux, végétaux, microorganismes (biocénose), vivant et interagissant les uns avec les autres au sein d'un environnement, caractérisé par des conditions physico-chimiques, climatiques, édaphiques, favorables à leur développement (biotope), avec lequel ils entretiennent des interactions. Les conditions de vie des milieux hypogés diffèrent considérablement de celles des milieux épigés. Les différences sont essentiellement d'ordre microclimatique, et liées aux ressources énergétiques.

Les écosystèmes cavernicoles sont très diversifiés et peuvent varier d'une région à une autre, que ce soit à l'échelle d'une localité, d'un pays, ou d'un continent. Les différences observées sont principalement attribuables à des variations géophysiques, à l'altitude, à la latitude, à la présence ou non d'eau, etc. Cependant malgré ces différences, les grottes partagent des caractéristiques communes, telles que la faible variation des températures au cours du temps, une hygrométrie généralement plus élevée qu'en surface, et une absence de lumière totale ou partielle (notamment aux entrées des cavités, éclairées en périodes diurnes). L'obscurité régnant dans les grottes conduit à une absence de végétaux ayant la capacité de réaliser la photosynthèse à la base de la chaîne alimentaire. Cette absence de producteurs primaires est la cause principale des quantités limitées de ressources énergétiques disponibles. Mis à part les éléments nutritifs contenus dans la matière organique issue des déjections de vertébrés vivant dans ces milieux, et les microorganismes capables de réaliser des synthèses organiques en absence de lumière (Lavoie, 1981), l'essentiel des ressources présentes dans les grottes résulte d'un apport extérieur. Il s'agit de détrit

organiques et débris végétaux de divers animaux, racines de plantes, drainés par des eaux d'infiltration, de ruissellement en provenance du milieu extérieur. Ces eaux d'infiltration, finissent pour la plupart par former de véritables rivières souterraines au sein des cavités (Howarth, 1983). Les milieux cavernicoles sont à la fois isolés géographiquement, relativement clos, limitant les échanges entre des populations ayant des habitats différents et favorisant ainsi l'isolement de ces dernières et d'éventuels phénomènes de spéciation accompagnés d'un remarquable degré d'adaptation, tant morphologique que fonctionnelle.

### **1.3.2. La faune cavernicole**

Avant les premières grandes expéditions dans les milieux souterrains, les espèces animales cavernicoles étaient considérées comme rares. Cependant les recherches entreprises ont permis de découvrir une faune diversifiée avec des distributions géographiques plus larges qu'on ne le pensait (Howarth, 1983). Elle colonise tous les espaces dans les milieux cavernicoles, y compris ceux non accessibles par l'homme. Divers auteurs ont proposé différentes classifications des animaux cavernicoles mais la référence est celle proposée par Schiner (Schiner, 1854), basée sur des critères écologiques, et mise à jour par Racovitza (Racovitza, 1907). Elle distingue les organismes troglaxènes, troglaphiles et troglobies :

- Les troglaxènes sont des animaux qui fréquentent les grottes temporairement pour des besoins liées à leur physiologie, souvent associés aux variations saisonnières (hibernation, estivation ou simple usage des grottes comme abri et lieu de repos), ou pour se nourrir. Les animaux troglaxènes accomplissent leurs cycles de reproduction en dehors des grottes, si bien qu'elles ne constituent pas des gîtes obligatoires.

- Les animaux troglaphiles sont des animaux présentant des adaptations à la vie en milieu hypogé. Ils s'y reproduisent et y sont retrouvés aux différents stades de développement grâce aux prédispositions qu'ils ont à vivre dans ces types



d'environnement. Cependant ces animaux sont également retrouvés dans les milieux épigés.

- Les animaux troglobies sont quant à eux des occupants permanents et obligatoires du domaine cavernicole. Ils ne peuvent survivre en dehors des grottes ; et sont qualifiés de « vrais cavernicoles ». Ils présentent des adaptations morphologiques et fonctionnelles marquées qui leur permettant d'y vivre de façon pérenne.

Si les animaux troglaxènes sont moins disposés à vivre de façon permanente dans les milieux cavernicoles, les animaux troglaphiles et troglobies sont eux dotés de capacités adaptatives physiologiques (troglaphiles et troglobies), mais surtout morphologiques prononcées (troglobies) issues de prédispositions génétiques. Les adaptations morphologiques correspondent dans certains cas à une réduction oculaire, d'une photophobie, voire une totale anophthalmie (absence d'yeux), telle qu'observée chez le protée ou certains poissons. Ces adaptations morphologiques peuvent prendre la forme d'une dépigmentation cutanée ou cuticulaire telles qu'observées chez certaines espèces d'escargots cavernicoles ; un allongement du corps et chez certains invertébrés tels que les insectes, un allongement des pattes et des segments antennaires (Figure 7), un tégument plus mince (Barr, 1968). Les différentes formes d'adaptation physiologiques, quant à elles, correspondent très souvent à un métabolisme ralenti, une modification du rythme circadien, une évaporation corporelle plus importante favorisée par un tégument plus mince. Chez certains insectes, elles se caractérisent aussi par un nombre d'œufs plus réduits mais de plus grande taille en comparaison avec les espèces épigées, ou une plus grande longévité (Barr, 1968; Renault, 2008),





**Figure 7** : *Leptodirus hochenwartii*



## Chapitre 2

# Insectes hématophages cavernicoles afrotropicaux et transmission d'agents infectieux

Ce chapitre présente l'entomofaune hématophage cavernicole de la région Afrotropicale. Il présente des généralités sur la morphologie et la systématique de la classe des insectes puis synthétise les connaissances sur les diptères hématophages des grottes d'Afrique tropicale et leur implication dans divers cycles naturels d'agents infectieux. Enfin, il présente les grottes du Gabon, leur situation géographique, leur contexte géologique ainsi qu'un état des lieux des recherches sur la faune entomologique cavernicole du Gabon.

La revue bibliographique consacrée à ce chapitre, ainsi qu'au chapitre 3 a donné lieu à l'écriture d'un article de revue (**Article 1**) intitulé "Diversity and role in pathogen transmission of cave-dwelling hematophagous insects in the Afrotropical region", et actuellement soumis à *Emerging Microbes and Infections*.

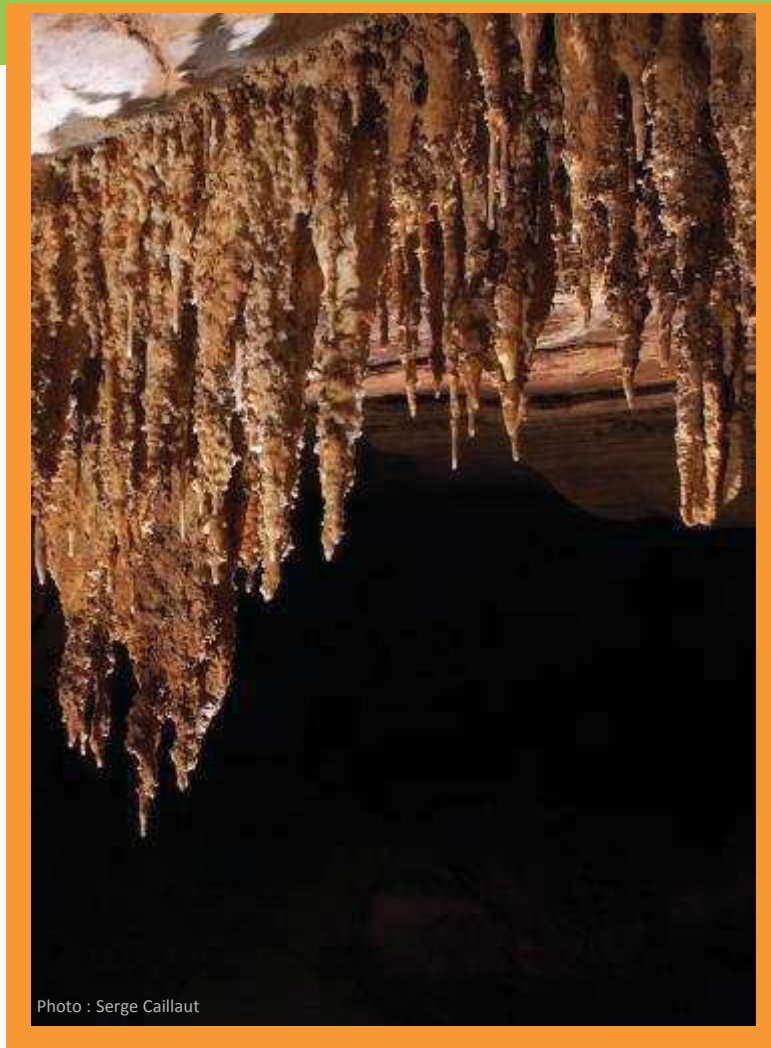


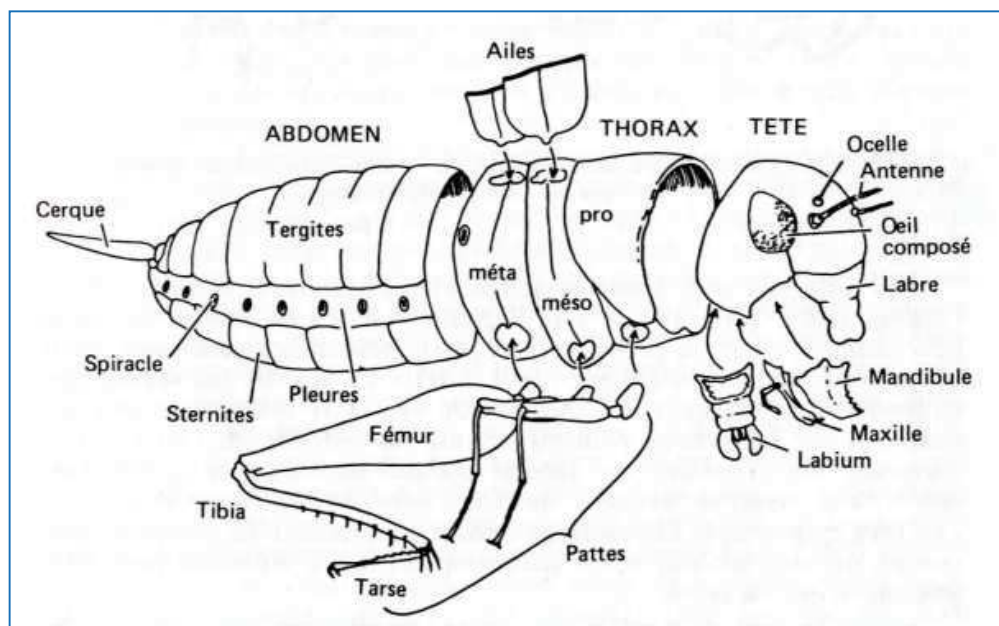
Photo : Serge Caillaut

## 2.1. Généralités

Les insectes (Figure 8) constituent une classe d'invertébrés de l'embranchement des arthropodes, l'un des plus riches du règne animal (près de 85% des espèces animales connues)(Rodhain and Perez, 1985). Comme tous les arthropodes, ils possèdent un corps formé de plusieurs segments articulés recouverts le plus souvent chez les adultes de chitine (formé d'acétate d'un polysaccharide dont l'élément principal est la glucosamine) et formant un exosquelette rigide. Ces segments sont organisés en trois ensembles distincts : tête, thorax et abdomen. La tête est formée de plusieurs segments (ou pièces) soudés entre eux par des lignes de suture. Elle possède une paire d'antennes articulées ; une partie d'yeux composés, parfois des ocelles, ainsi que les pièces buccales constituées de quatre principaux ensembles d'appendices formant le labre, labium, les mandibules et les maxilles. Ces pièces buccales présentent une variabilité qui est fonction du régime alimentaire. Le thorax est constitué de trois principaux segments que sont le prothorax, le mésothorax et le métathorax. Il porte les organes locomoteurs, notamment les ailes (deux paires principalement), ainsi que trois paires de pattes organisées individuellement en fémur, tibia et tarse. L'abdomen, portant le plus grand nombre de segments, constitue la partie postérieure du corps des insectes. Le nombre de segments est 11 chez les insectes primitifs et de 10 chez les insectes plus évolués (Rodhain and Perez, 1985). L'abdomen porte essentiellement les organes digestifs et excréteurs, ainsi que les éléments constitutifs du système respiratoire et les organes reproducteurs formés par les segments les plus apicaux.

Les insectes, à l'image de l'ensemble des arthropodes, sont caractérisés par un développement morphologique discontinu, par mues successives et périodiques. Ces mues s'opèrent durant les stades pré-imaginaux, c'est-à-dire larvaires ; le stade *imago*, c'est-à-dire « adulte », étant le stade final de développement. Chez les insectes il existe deux grands types de développements, le développement hétérométabole et le

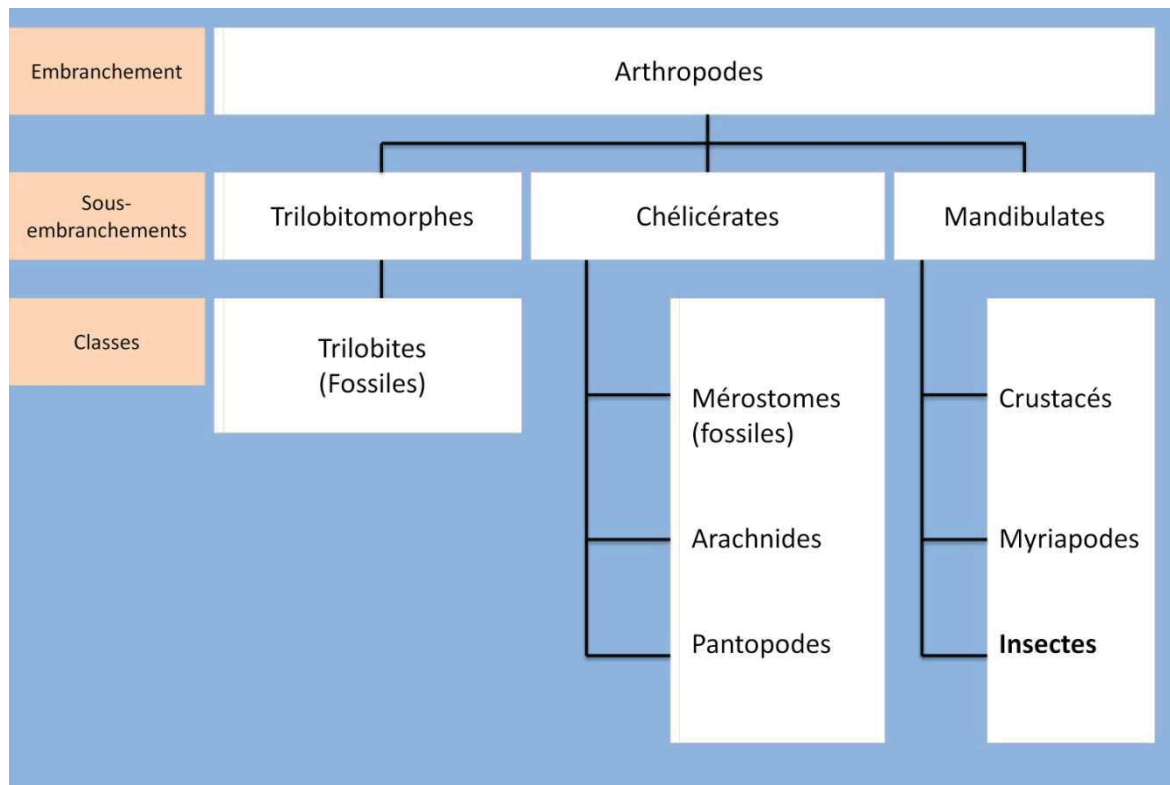
développement holométabole. Les insectes hétérométaboles sont des insectes dits à métamorphose incomplète, c'est-à-dire ceux dont la larve issue de l'œuf est semblable morphologiquement à la nymphe et à l'adulte. La différence entre les stades concerne principalement la taille et la maturité sexuelle. A la différence des insectes hétérométaboles, les insectes holométaboles se caractérisent par une métamorphose dite complète. En d'autres termes chez ces derniers, la larve, la nymphe et l'adulte diffèrent considérablement, tant sur le plan morphologique (transformations morphologiques profondes menant la larve, d'aspect vermiforme, au stade adulte généralement ailé) que sur le plan écologique (la larve et l'adulte ont des modes de vie différents dans des milieux différents).



**Figure 8** : Morphologie générale d'un insecte (Harood and James, 1979)

Les insectes, encore appelés « hexapodes » (constitués de trois paires de pattes), font partie du sous-embranchement des mandibulés (Figure 9) et peuvent être aisément classés en ordres, familles, genres et espèces grâce à leurs caractéristiques morphologiques, voire moléculaires. Selon Rodhain et Perez, « la classification zoologique est donc l'arrangement hiérarchique des catégories taxonomiques en ordre

*naturel (ou estimé tel) » (Rodhain and Perez, 1985). Elle est l'objet de la systématique, une discipline reposant sur un ensemble de principes permettant de classer et d'établir des liens entre les différentes catégories taxonomiques des êtres vivants, encore appelées « taxons ».*



**Figure 9 :** Classification des arthropodes

Chez les insectes l'ordre des « Diptères » constitue de loin l'un des plus importants pour la santé humaine et animale, notamment parce qu'il comprend de nombreux insectes hématophages responsables de la transmission d'agents infectieux aux hôtes vertébrés qu'ils piquent. Les diptères représentent près des trois quarts des arthropodes et colonisent divers types de milieux dans le monde entier, à différentes altitudes et latitudes. Ils sont très diversifiés dans la région Afrotropicale et sont retrouvés aussi bien dans les milieux épigés que souterrains (Howarth, 1972, 1982). Avec plus de 100 000 espèces, chiffre qui pourrait être multiplié par cinq au regard des récentes découvertes et estimations de leur nombre (Matile, 1994), les diptères représentent une importante partie de la biomasse des invertébrés cavernicoles et



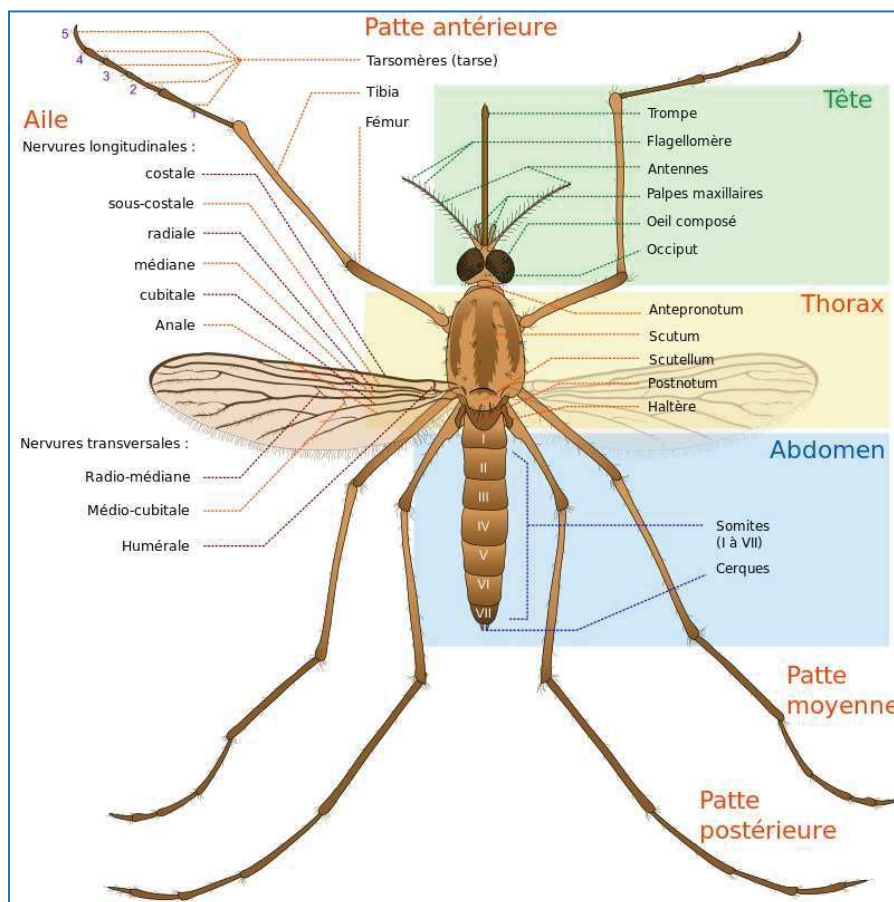
occupent ainsi un rôle central dans le fonctionnement de ces écosystèmes, ainsi dans l'épidémiologie des agents infectieux à potentiel zoonotique qui y circulent.

## 2.2. Diptères hématophages cavernicoles d'Afrique tropicale

### 2.2.1. Culicidae

#### 2.2.1.1. Morphologie générale et rappels systématiques

Les Culicidae (Figure 10), communément appelés « moustiques », se répartissent en trois sous-familles : Toxorhynchitinae, Anophelinae et Culicinae. Ces sous-familles se distinguent par des caractères morphologiques, tant chez les individus adultes (imago) que chez stades pré-imaginaux.



**Figure 10:** Morphologie générale d'un moustique adulte.  
(source : <http://entomology.ucdavis.edu>)

Les espèces appartenant à la sous-famille des Toxorhynchitinae sont regroupées au sein d'un seul genre, *Toxorhynchites*, comprenant 90 espèces (Systematic Catalog of Culicidae : [www.mosquitocaralog.org](http://www.mosquitocaralog.org)). La sous-famille des Anophelinae est subdivisée en trois genres, *Anopheles*, *Bironella* et *Chagasia*. Les deux dernières sous-familles n'ont pas d'importance médicale ou vétérinaire contrairement aux espèces du genre *Anopheles*. Il existe plus de 480 espèces d'anophèles à travers le monde (Systematic Catalog of Culicidae : [www.mosquitocatalog.org](http://www.mosquitocatalog.org)). La troisième sous-famille, celle des Culicinae, constitue la plus importante (en terme du nombre d'espèces) et comprend plus de 3000 espèces (Systematic Catalog of Culicidae : [www.mosquitocatalog.org](http://www.mosquitocatalog.org)). Les genres les plus importants sont *Culex* et *Aedes*, pour lesquels on compte respectivement près de 800 et plus 1700 espèces (Systematic Catalog of Culicidae : [www.mosquitocatalog.org](http://www.mosquitocatalog.org)).

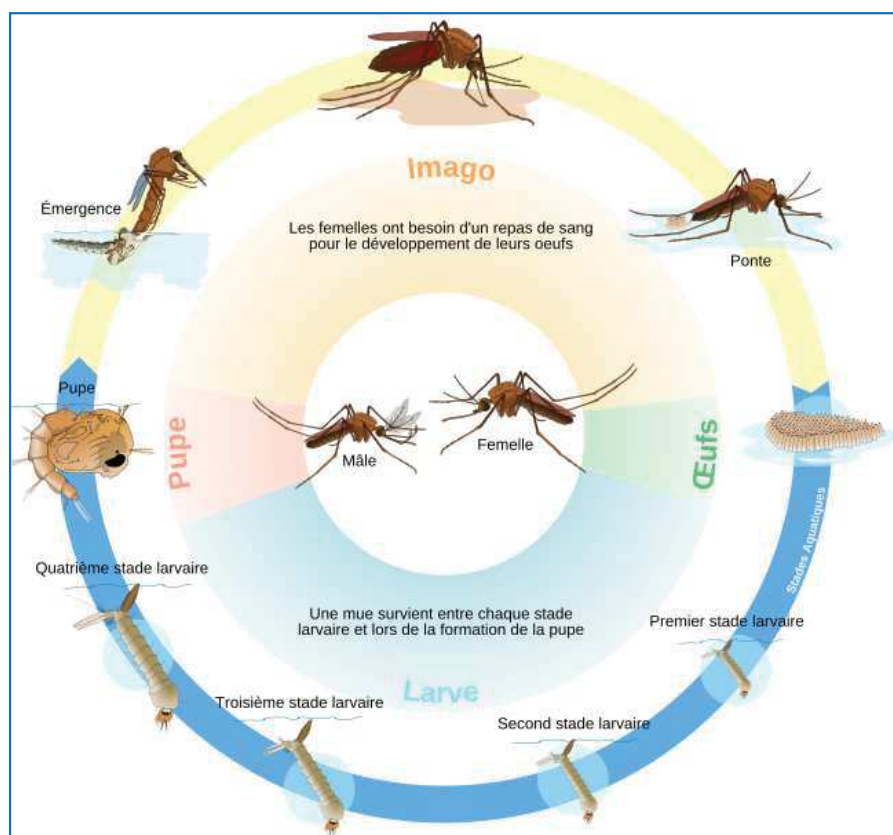
Les moustiques présentent des aspects morphologiques diverses en fonction des unités taxonomiques. Les stades immatures (œufs, larves et nymphes) mènent une vie aquatique. Les œufs sont pourvus de flotteurs latéraux et pondus isolément (Anophelinae), ou dépourvus de flotteurs et pondus ensemble (Toxorhynchitinae et Culicinae). Malgré les différences morphologiques caractéristiques des unités taxonomiques, les larves de moustiques sont reconnaissables par leur aspect vermiforme. Elles sont pourvues de siphons (Culicinae et Toxorhynchitinae) ou de soies palmées (Anophelinae) en guise d'organe respiratoire. Les nymphes (pupes) possèdent des palettes natatoires et des trompes respiratoire. Elles demeurent sans se nourrir jusqu'à l'émergence des formes adultes. Chez les adultes, les moustiques de la sous-famille des Toxorhynchitinae se reconnaissent aisément par leur grande taille, aux couleurs d'aspect métallique et à la longue trompe recourbée vers le bas. Ce sont des moustiques possédant de courts palpes chez les femelles, mais aussi longs que la trompe chez les mâles. Ils sont particulièrement caractérisés par le bord antérieur de



l'aile échancré à proximité de la nervure cubitale. Les Anophelinae se reconnaissent principalement chez les adultes par des palpes aussi longs que la trompe chez les deux sexes et la présence d'un scutellum unilobé. Les Culicinae sont des moustiques dont les adultes possèdent un scutellum trilobé et un abdomen couvert de nombreuses écailles. Les femelles possèdent des palpes courts, tandis qu'ils sont aussi longs que la trompe chez les mâles.

### 2.2.1.2. Cycle biologique et écologie

Bien qu'il existe des particularités propres à chaque genre et parfois à chaque espèce, les moustiques ont un cycle de vie généralisable (Figure 11) comprenant une phase aquatique, durant laquelle se développent les stades pré-imaginaux (œufs, larves et nymphes), et une phase aérienne pour les adultes.



**Figure 11:** Cycle de reproduction des moustiques  
(source : <http://entomology.ucdavis.edu>)

Les femelles gravides pondent les œufs sur l'eau (ou sur des substrats humides chez certaines espèces). Le nombre d'œufs pondus par femelle est fonction des espèces, et est de l'ordre de 100 à 400 par ponte. Après une période de 2 à 3 jours, les œufs éclosent pour libérer des larves de stade 1 qui donneront successivement lieu à des larves de stades 2, 3 et 4 entrecoupées de mues. La durée de la phase larvaire est dépendante de la température, mais est dans les conditions les plus propices (en milieu tropical) de l'ordre de 6-7 jours (Rodhain and Perez, 1985). La larve 4 se transforme en une nymphe, qui correspond à un stade qui ne se nourrit pas et duquel émergera un adulte aérien au bout de 1 à 2 jours. Après leur émergence (généralement 1 jour avant les femelles), les mâles s'accouplent avec les femelles. Ils se dispersent peu autour de leur gîte d'émergence ou volent en essaims, et se nourrissent pour la plupart d'eau et de nectar. A quelques exceptions près, les femelles, en plus de se nourrir de nectar, sont hématophages. Les nutriments issus de la digestion du sang sont indispensables à la production d'œufs.

Les habitats larvaires des moustiques sont presque toujours des collections d'eau naturelles ou artificielles. Certains de ces gîtes (notamment les gîtes naturels) sont caractérisés par la présence d'une abondante végétation constituée d'algues, de feuilles dressées ou flottantes. Les Anophelinae pondent généralement leur œufs dans des eaux calmes localisées dans des environnements ensoleillés (mares permanentes ou temporaires, sur les bordures de lacs, les anses peu agitées des rivières, des empreintes de pas pourvu d'eau, etc.). Certaines espèces colonisent également les réseaux d'irrigation, les rizières ou les lacs de retenue (gîtes artificiels). Les Toxorhynchitinae et les Culicinae pondent généralement leur œufs dans des gîtes naturels et artificiels tels que les creux d'arbres, les feuilles engainantes de plantes telles que les bananiers,

les tiges de bambous, les creux de rocher, les mares herbeuses, les bords de rivières, des récipients domestiques, les décharges d'ordure, etc.

Chez les moustiques, les larves se nourrissent de micro-organismes et de débris organiques présents dans le gîte. Les moustiques peuvent être diurnes ou nocturnes et peuvent présenter des comportements alimentaires pouvant varier en fonction des différentes unités taxonomiques. Il existe des espèces plus agressives que d'autres ; des espèces anthropophiles ou zoophiles, se nourrissant généralement sur les mammifères, les oiseaux et les reptiles.

### **2.2.1.3. Les Culicidae des grottes d'Afrique tropicale**

Les efforts d'investigations scientifiques sur les Culicidae cavernicoles, motivées par la recherche sur la transmission du paludisme et des parasites hémospodidies, se sont concentrés principalement sur les espèces du genre *Anopheles* (*An.*). Ainsi l'un des premiers anophèles cavernicoles découverts a été l'espèce *Anopheles vanhoofi*, décrite lors de prospections dans la grotte de Thysville en République Démocratique du Congo (RDC) (Wanson and Lebled, 1945). Plus tard Leleup et Lips feront la description d'*An. rodhaini* à partir de spécimens récoltés dans la grotte de Kakontwe à Jadotville (actuellement Likasi dans la province du Katanga, RDC) (Leleup and Lips, 1950a, 1951). De nombreuses descriptions suivront avec l'intérêt grandissant pour l'entomofaune cavernicole et l'intensification des recherches dans les grottes d'Afrique intertropicale, notamment en République démocratique du Congo, République du Congo, Cameroun, en Guinée (Tableau I).

### **2.2.1.4. Implication dans la transmission d'agents infectieux**

Les Culicidae constituent le groupe de vecteurs le plus important en santé publique humaine. Ils sont responsables de la transmission de plusieurs agents infectieux pathogènes pour l'homme, causant des maladies telles que le paludisme, les filarioses,

et de nombreuses arboviroses (Gouveia de Almeida, 2011). Ces maladies, en particulier le paludisme, sont les principales causes de morbidité et de mortalité pour les hommes. Le paludisme, causé par un parasite du genre *Plasmodium*, est principalement transmis par les moustiques du genre *Anopheles*. De nombreux parasites responsables de filarioses ont pour vecteurs des moustiques. C'est le cas de

**Tableau I** : Les Culicidae cavernicoles connus d'Afrique tropicale

Espèces	Site	Pays	Référence
<i>An. vanhoofi</i>	Mbanza-Ngungu	RDC	Wanson et Lebiec, 1945
<i>An. rodhaini</i>	Likasi	RDC	Leleup, 1950
<i>An. faini</i>	Yolaha firi	RDC	Leleup, 1952
<i>An. smithii rageaui</i>	Oliga	Cameroun	Mattingly et Adam, 1954
<i>An. cavernicolus</i>	Dalaba region	Guinée	Abonnenc, 1954
<i>An. vanthieli</i>	Irangi	RDC	Laarman, 1959
<i>An. caroni</i>	Matouridi	Congo-Brazzaville	Adam, 1961
<i>An. hamoni</i>	Meya Nzouari	Congo-Brazzaville	Adam, 1962
<i>An. pauliani</i>	Aven Anjohy	Madagascar	Remillet, 1973
<i>Ur. cavernicola</i>	Yoloha firi	Congo-Brazzaville	Mattingly, 1954
<i>Ur. fusca</i>	Bemaraha	Madagascar	Remillet, 1973
<i>Ma. uniformis</i>	Bemaraha	Madagascar	Remillet, 1973

la filaire de Bancroft (*Wuchereria bancrofti*), dont les vecteurs principaux figurent parmi les moustiques des genres *Culex* et *Anopheles* (Appawu et al., 2001; Vythilingam et al., 2005). Un grand nombre d'arbovirus est transmis dans les conditions naturelles par des moustiques. Ces arbovirus n'ont pas tous la même importance médicale et circulent pour la plupart chez des animaux. Cependant une faible proportion est susceptible d'affecter l'homme, dont la fièvre jaune, la dengue, le Zika, le chikungunya, le virus West Nile, la fièvre de la vallée du rift.... Pour

l'ensemble de ces maladies, des différences considérables sont observées concernant la distribution géographique, le degré d'endémicité et l'épidémiologie. En dehors des populations humaines, les moustiques assurent également la transmission de nombreux agents infectieux parasitaires et viraux parmi les populations de mammifères, d'oiseaux, de reptiles et d'amphibiens (Rodhain and Perez, 1985).

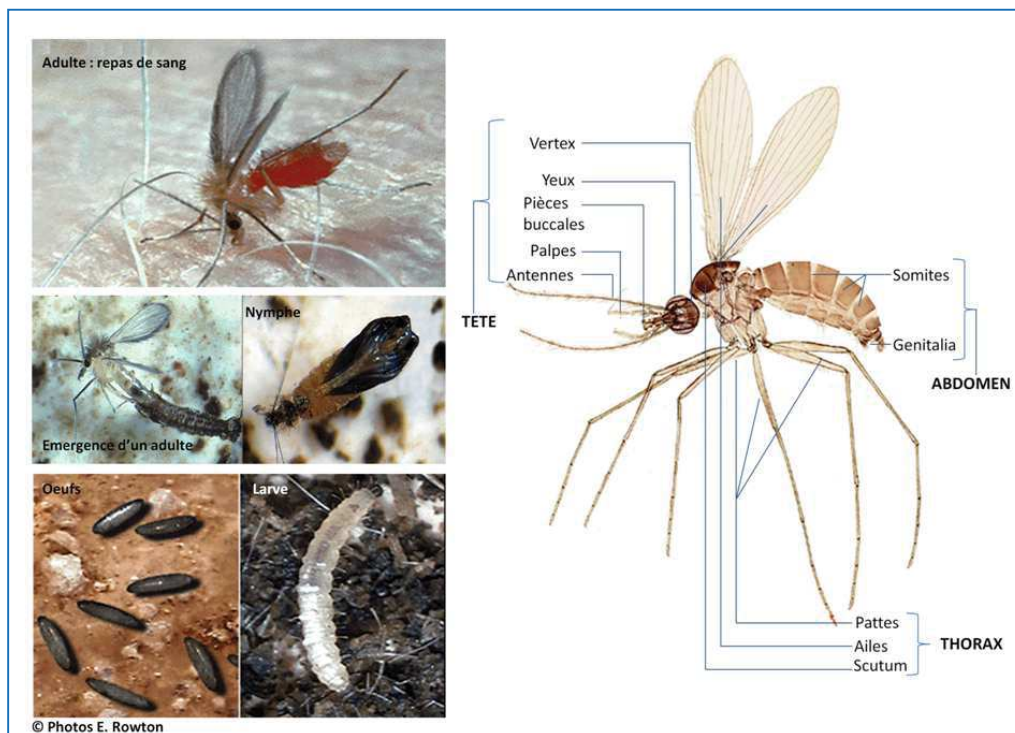
Dans l'état actuel de nos connaissances, aucun cycle d'arbovirus impliquant des moustiques n'a été décrit dans les milieux cavernicoles d'Afrique tropicale. Cependant des preuves d'infection de chauves-souris, reconnues comme cavernicoles ou susceptibles de coloniser des grottes, par divers virus ont été obtenues en Afrique Centrale (Leroy et al., 2005; Maganga et al., 2011; Pourrut et al., 2009), de l'Ouest (Quan et al., 2013; Quan et al., 2010), et de l'Est (Kuzmin et al., 2011). Les infections par des hémospodidies, notamment du genre *Plasmodium* (*Pl.*), chez des chauves-souris et/ou des rongeurs cavernicoles, ont en revanche été davantage documentées. Plusieurs espèces de Culicidae cavernicoles ont été incriminées dans la transmission de tels parasites. C'est le cas d'*An. smithii rageaui*, chez qui des sporozoïtes de *Plasmodium atheruri* Van Den Berghe, Lammbrecht et Zaghi un parasite infectant le porc-épic *Atherurus africanus* Gray au Cameroun, ont été observés dans les glandes salivaires (Mouchet et al., 1957a). Le rôle dans la transmission de ce parasite a également été démontré pour *An. vanthieli* Laarman en RDC (Van Den Berghe et al., 1958) et au Ghana (Brady, 1964). Deux autres espèces, *An. caroni* Adam et *An. hamoni* Adam, ont été démontrées comme de bons vecteurs de ce parasite dans des grottes de la République du Congo (Adam, 1974a). Les espèces du complexe *Anopheles smithii* sont également considérées comme vecteurs de *Pl. voltaicum* Van der Kaay, infectant des chauve-souris appartenant aux espèces *Rousettus smithi* Thomas au Ghana et *Lissonycteris angolensis* Bocage en République du Congo (Adam, 1974c; Adam and Landau, 1970 ). D'autres *Plasmodium* infectent des chauves-souris cavernicoles sans que leurs vecteurs ne soient déterminés. C'est la

cas de *P. rousetti* Van Riel, parasitant spécifiquement *Rousettus laechei* Geoffroy dans une grotte de RDC (Adam, 1965b).

## 2.2.2. Phlebotominae

### 2.3.2.1. Morphologie générale et rappels systématiques

Les phlébotomes (Figure 12) sont des Diptères Nématocères appartenant à la famille des Psychodidae et à la sous-famille des Phlebotominae Kertész (Abonnenc, 1972). Plus de 600 espèces de phlébotomes sont connues à travers le monde.



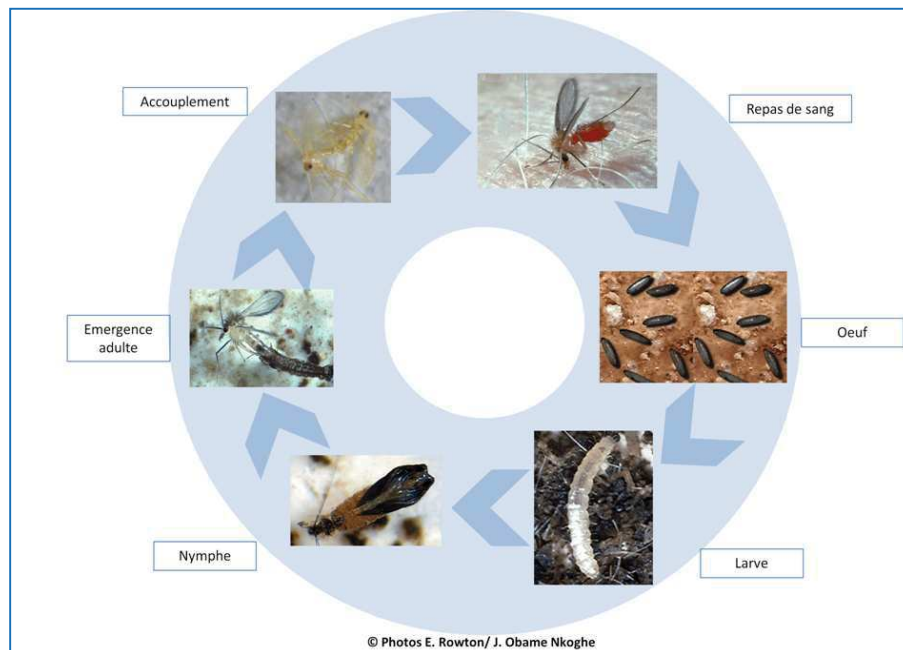
**Figure 12** : Phlébotome : stades évolutifs et morphologie de l'adulte

Ces espèces sont réparties en 29 genres (Marcondes, 2007). Ils correspondent à des insectes de petite taille, très velus, de couleur généralement pâle (jaune, grisâtre ou brunâtre), et avec un aspect bossu au niveau du thorax. Ces insectes possèdent une tête arrondie avec de grands yeux d'aspect sombre. Ils sont munis d'une trompe assez courte et d'une paire d'ailes fines, velues et de forme lancéolée qui sont généralement relevées lorsque l'insecte est au repos. Les mâles se reconnaissent à leurs organes

copulateurs très développés à l'extrémité postérieure de l'abdomen. Chez les stades pré-imaginaux, les œufs ont une forme allongée et légèrement incurvée (Figure 12). Les larves sont d'aspect vermiforme et d'une longueur généralement supérieure à celle de l'adulte (Figure 12). La nymphe, de taille beaucoup plus réduite, est constituée d'un céphalothorax qui se distingue bien de l'abdomen dont les segments terminaux sont enfouis dans l'exuvie larvaire qui reste fixée au substrat.

### 2.2.2.2. Cycle biologique et écologie

Le cycle biologique des phlébotomes (Figure 13) comprend une phase pré-imaginale (œuf, larve et nymphe) se déroulant en milieu terricole riche en matière organique, et une phase adulte. Les femelles gravides pondent leurs œufs à même le substrat, qui constitue le gîte larvaire. La période d'incubation des œufs varie en fonction des espèces et de la température. Elle peut s'étendre de 4 à 17 jours. La larve issue de l'éclosion de l'œuf évolue par mues successives du stade 1 au stade 4 (Rodhain and Perez, 1985).



**Figure 13** : Cycle biologique des phlébotomes



La larve mène une vie terricole sédentaire et se nourrit des constituants organiques présents dans son environnement immédiat (débris organiques d'origine animale ou végétale). Au bout de cette période, la larve de stade 4 mue en nymphe, qui vit sans se nourrir, fixée sur le même substrat. Au bout d'une durée de vie nymphale pouvant s'étendre de 6 à 15 jours (Rodhain and Perez, 1985), un adulte émergera de la nymphe. Au stade adulte, seules les femelles sont hématophages. Les mâles s'accouplent avec les femelles qui vivent à proximité des hôtes vertébrés sur lesquels elles se nourrissent de sang pour assurer la maturation des œufs. Les préférences trophiques, variant en fonction des espèces, vont conditionner le choix d'habitat de ces dernières. Les femelles gravides recherchent généralement des gîtes calmes pour y pondre. Ces gîtes sont généralement des terriers, des abris sous roches, des troncs d'arbres, des fissures pariétales de rochers ou de falaises, ou des termitières, caractérisés par une faible luminosité, une hygrométrie élevée et de faibles courants d'air, à proximité d'hôtes vertébrés indispensables aux repas de sang. Ces conditions environnementales sont généralement réunies dans des environnements hypogés, notamment les grottes.

### **2.2.2.3. Les Phlebotominae des grottes d'Afrique tropicale**

Après la région Néotropicale, l'Afrique tropicale constitue la région qui héberge le plus grand nombre d'espèces de phlébotomes (160 espèces) (Seccombe et al., 1993). Dans les milieux épigés, l'Afrique est dominée par les espèces du genre *Sergentomyia*, plus abondants dans les pays de l'Ouest, et par les espèces du genre *Phlebotomus*, plus abondants dans les pays de l'Est (Abonnenc, 1972).

Si plusieurs espèces d'Afrique tropicale ont été signalées et étudiées en divers milieux épigés, les études menées en milieux hypogés sont demeurées très localisées. Cependant les investigations menées dans diverses grottes ont permis de décrire plusieurs espèces et ainsi de dresser un inventaire de la faune phlébotomienne



cavernicole. Parmi ces espèces, cinq ont été retrouvées dans des grottes d'Afrique Centrale, où l'essentiel des travaux ont été menés en Afrique. Ainsi *Spelaeophlebotomus gigas* Parrot et Schwetz fut l'une des premières décrites dans des grottes rocheuses, de Mbanza-Ngungu (ancien Thysville), et près de la localité de Matadi, en République Démocratique du Congo (Parrot and Schwetz, 1937; Parrot and Wanson, 1938). Des années plus tard d'autres espèces ont été décrites, comme *Spelaeomyia mirabilis* Parrot et Wanson (Parrot and Wanson, 1946) dont l'aire de répartition est limitée en RDC et au Congo-Brazzaville, *Spelaeomyia moucheti* Vattier-Bernard et Abonnenc retrouvée dans des grottes du Cameroun et en République Centrafricaine (Vattier-Bernard and Abonnenc, 1967). L'ensemble des prospections effectuées dans les milieux cavernicoles africains par divers auteurs ont permis de montrer que certaines de ces espèces avaient une distribution géographique large, comme par exemple l'espèce *Sl. gigas* qui est présente dans plusieurs pays d'Afrique Centrale et de l'Ouest, alors qu'elle a longtemps été considérée comme endémique à la seule RDC. L'essentiel des connaissances sur les phlébotomes cavernicoles africains repose principalement sur les travaux de quelques chercheurs ayant longtemps prospecté les grottes d'Afrique Centrale et de l'Ouest. Ainsi une mise au point des connaissances a permis de répertorier huit espèces signalées dans une trentaine de grottes, distribuées dans neuf pays, dont la République de Guinée-Conakry, le Mali, le Cameroun, la République Centrafricaine, le Gabon, la RDC, la Somalie, le Soudan et le Congo-Brazzaville, où le plus grand nombre d'espèces a été rapporté. Ainsi à la liste des trois espèces (*Sl. gigas*, *Sa. mirabilis* et *Sa. moucheti*) s'ajoutent *Sa. darlingi* Lewis et Kirk (Mali et Soudan), *Se. balmicola* Abonnenc, Adam et Bailly-Choumara (Cameroun), *Ph. somaliensis* Adam et Bailly-Choumara (Somalie), *Sa. crypticola* Adam et Bailly-Choumara (Mali) et *Sa emilii* Vattier-Bernard (Congo-Brazzaville) (Vattier-Bernard and Adam, 1969). Des huit espèces cavernicoles connues, *Sl. gigas* et *Sa. mirabilis* ont fait l'objet d'investigations bio-

écologiques détaillées, avec un accent particulier sur l'étude de l'évolution des différents stades de développement (larves, nymphes et imago), des préférences trophiques, du cycle gonotrophique et des conditions microclimatiques favorables à leur développement. Ces études ont montré les différences, principalement physiologiques, que présentent les espèces cavernicoles vis-à-vis les espèces épigées. Les résultats ont montré que le fonctionnement physiologique de ces deux espèces cavernicoles exige un métabolisme plus lent par rapport aux espèces épigées. Ce métabolisme « lent » a pour conséquences une durée plus longue du développement des stades pré-imaginaux, un allongement du développement embryonnaire et post-embryonnaire, un nombre de ponte peu élevé par rapport aux espèces épigées (Vattier-Bernard, 1970b). Pour les autres espèces cavernicoles, de nombreuses questions demeurent.

#### **2.2.2.4. Implication dans la transmission d'agents infectieux**

L'importance médico-vétérinaire des phlébotomes tient au rôle que jouent certaines espèces comme vecteurs de maladies humaines et animales. Si des études en milieux épigés ont montré que les phlébotomes sont impliqués dans la transmission de divers agents infectieux tels que les bartonellose, les arboviroses (Rodhain and Perez, 1985), ces insectes sont cependant plus connus pour leur rôle dans la transmission de leishmanioses à travers le monde (Abonnenc, 1972). Les principaux vecteurs sont répartis dans les genres *Phlebotomus* (*Ph.*) et *Sergentomyia* (*Se.*), notamment en Afrique, en région paléarctique et orientale, et *Lutzomyia* (*Lu.*) en Amérique (Abonnenc, 1972).

Il est difficile dans l'état actuel de nos connaissances d'établir le statut de vecteur des phlébotomes cavernicoles, et en particulier en Afrique tropicale. Des études antérieures ont permis de détecter la présence de trypanosomes de chauves-souris dans l'intestin moyen et postérieur des phlébotomes cavernicoles (Adam, 1973b). En

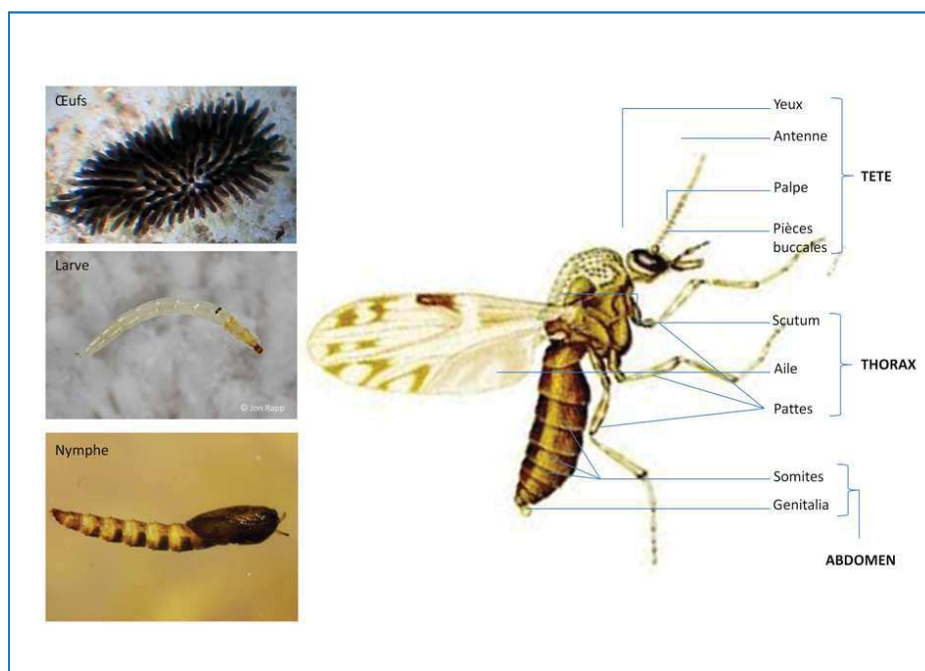
revanche les recherches des stades infectants se sont révélées infructueuses. Le rôle de *Sa. mirabilis* dans la transmission de parasites Trypanosomatidae, *Trypanosoma vespertilionis* Battaglia, a été cependant suspecté (Adam, 1973b).

A l'heure actuelle, il n'existe aucun élément permettant de démontrer l'implication des phlébotomes cavernicoles dans la transmission de virus aux animaux cavernicoles. Néanmoins au vu de leur implication dans la transmission d'arbovirus (Rodhain and Perez, 1985) il est fort probable qu'ils jouent également un rôle de vecteur dans les grottes.

### 2.2.3. Ceratopogonidae

#### 2.2.3.1. Morphologie générale et rappels systématiques

Les Ceratopogonidae (Figure 14) sont de petits insectes diptères reconnus pour causer d'importantes nuisances mais également de nombreuses affections humaines et animales. Les adultes sont munis d'une tête portant une paire d'antennes comprenant



**Figure 14:** Ceratopogonidae : stades évolutifs et morphologie de l'adulte

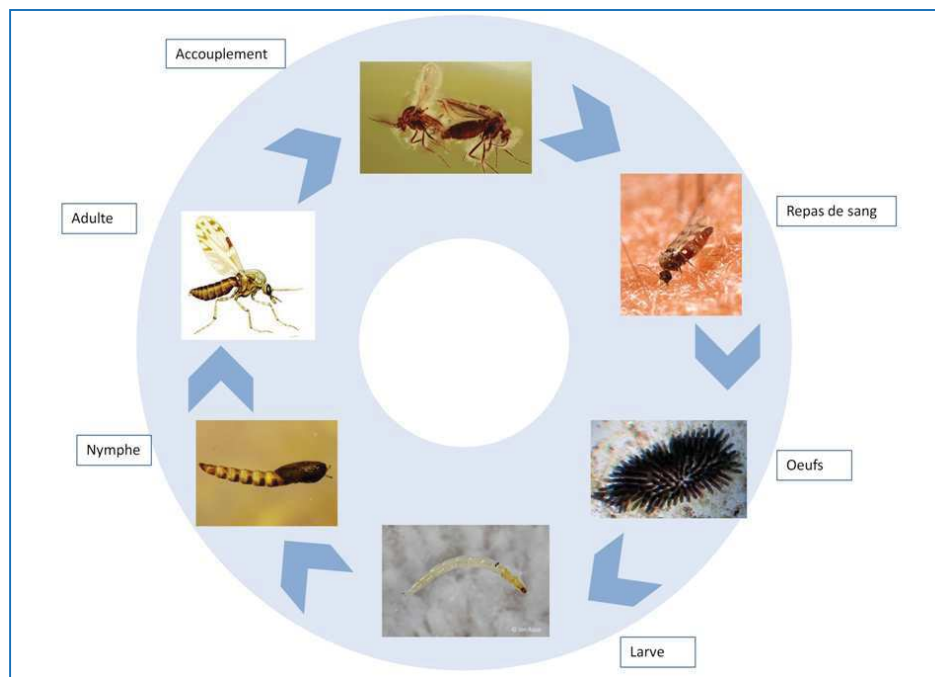
généralement de 13 à 15 segments. Les yeux sont volumineux associés ou non à des ommatidies et les pièces buccales sont de type piqueur. Le thorax est d'aspect légèrement bossu et dominé par le mésothorax plus volumineux que le pro- et le métathorax. Les pattes sont courtes et trapues et les ailes, dépourvues d'écailles, sont tachetées. La nervation des ailes ainsi que la présence de deux cellules radiales sont caractéristiques de la famille. L'abdomen est formé de 10 segments. Chez la femelle, l'organe génital s'ouvre sur le 8ème segment, tandis que chez le mâle il est formé par le 9ème segment. Les œufs de Ceratopogonidae sont de forme allongée, munis d'une fente sur l'un des pôles et parfois ornementés de soies ou de spicules (Rodhain and Perez, 1985). Les larves, d'aspect vermiforme, sont généralement aquatiques et mesurent en moyenne 8 mm de long. Les nymphes, classique de Nématocère, mesurent 2mm de long et sont caractérisées par la présence de deux cornes respiratoires sur le céphalothorax.

La famille des Ceratopogonidae regroupe plus de 1300 espèces réparties en quatre sous-familles (Dasyheleinae, Leptoconopinae, Forcipomyiinae et Ceratopogoninae) et plus de cinquante genres (Cornet, 1981; Rodhain and Perez, 1985) dont plus de la moitié est regroupée au sein de la sous-famille des Ceratopogoninae. Seuls quatre genres (*Leptoconops*, *Austroconops*, *Forcipomyia* et *Culicoides*) ont une importance médicale ou vétérinaire, avec une prédominance des *Culicoides* qui sont particulièrement attirés par les vertébrés pour le repas sanguin.

### 2.2.3.2. Cycle biologique

Le cycle biologique des Ceratopogonidae comprend deux phases (Figure 15) : une phase aquatique ou semi-aquatique (stades pré-imaginaux) et une phase aérienne (adultes). Les femelles gravides pondent les œufs dans des gîtes aqueux ou semi-aqueux riches en matière organique, localisés sur les sols ou les troncs d'arbres. Les œufs éclosent à l'issue d'une période comprise entre 2 et 15 jours et libèrent des

larves de stade 1 qui vont évoluer par mues successives jusqu'au stade 4, puis en nymphe. Les nymphes sont peu mobiles et se tiennent généralement verticalement en surface de l'eau, respirant par les cornes respiratoires. Au bout d'une période de 2 à 10 jours les nymphes évoluent en adultes. Ces derniers se nourrissent de nectar, cependant les femelles de certaines espèces sont hémaphages et se gorgent sur des vertébrés parmi les oiseaux, les mammifères, les amphibiens et les reptiles.



**Figure 15** : Cycle biologique de Ceratopogonidae

### 2.2.3.3. Les Ceratopogonidae des grottes d'Afrique tropicale

Les Ceratopogonidae, en particulier ceux du genre *Culicoides* constituent un groupe de diptères ayant fait l'objet de nombreuses études. Un grand nombre d'espèces, regroupées en particulier au sein du genre *Culicoides*, ont été reportées dans les milieux épigés afrotropicaux. Si ce groupe a été bien étudié en Afrique de l'ouest, de l'est et du sud (Canute et al., 1971; Cornet, 1981; Glick, 1990), il demeure peu documenté en Afrique Centrale. Les rares travaux de référence dans la région sont ceux menés par Callot, Itoua et leurs collaborateurs qui ont réalisé des inventaires des espèces du genre *Culicoides* (Callot et al., 1965; Itoua and Cornet,

1986; Itoua et al., 1987b). Les groupes d'espèces *distinctipennis*, *milnei*, *fulvithorax*, *pallidipennis*, *trifasciellus* ont fait l'objet d'études pour préciser leurs comportements alimentaires. Cependant ces insectes demeurent encore largement méconnus en milieu cavernicole sur l'ensemble du continent. Dans les grottes d'Afrique, l'essentiel des connaissances reposent sur des travaux menés il y a plusieurs décennies dans les grottes du Congo-Brazzaville et qui ont permis de répertorier plus d'une vingtaine d'espèces, dont une quinzaine nouvelles pour la Science (Vattier-Bernard and Adam, 1969). Une grande partie de l'échantillonnage réalisé était constituée d'espèces non hématophages (18 espèces), et seules deux espèces, appartenant au genre *Culicoides* (*C. grenieri* Vattier et Adam et *C. rageaui* Vattier et Adam) étaient signalées et toujours avec de faibles densités.

#### 2.2.3.4. Implication dans la transmission d'agents infectieux

Les Ceratopogonidae, en particulier les *Culicoides*, sont reconnus comme des vecteurs de parasites (filaires et hémospories), mais aussi de divers virus (Cornet, 1981). A ce jour ces insectes sont connus pour leur rôle dans la transmission de plus d'une vingtaine de filaires, de plus d'une quinzaine d'hémospories et de plus une soixantaine d'arbovirus (Borkent, 2005). Plusieurs espèces de filaires, comme *Mansonella perstans* Manson, *M. streptocerca* Macfie et Corson (chez l'homme) et *Onchocerca cervicalis* Railliet et Henry et *O. gutturosa* Neumann (chez les animaux) sont transmises par des *Culicoides* appartenant aux groupes *imicola* ou *milnei* (Rodhain and Perez, 1985). Plusieurs hémospories, parasitant des animaux, sont connues pour être transmis de façon naturelle par des Ceratopogonidae. Il s'agit principalement des hémospories des genres *Leucocytozoon*, *Haemoproteus* (parasitant des reptiles, des oiseaux) et *Hepatocystis* (parasitant des mammifères et particulièrement des singes et des chauves-souris) (Rodhain and Perez, 1985).

L'implication des Ceratopogonidae dans la transmission d'arbovirus est très importante au regard du nombre de virus transmis, mais également du fait de l'impact économique et sanitaire engendrés par ces derniers. Ces virus sont principalement des membres des genres *Orbivirus*, *Bunyavirus* et *Lyssavirus*, qui représentent à eux seuls plus de la moitié des virus associés aux Ceratopogonidae. A l'heure actuelle, un seul *Bunyavirus* pathogène pour l'homme, le virus Oropouche, est régulièrement transmis par les Ceratopogonidae (Robert et al., 1981). En santé animale, le plus connu des virus transmis par Ceratopogonidae est le virus de la Bluetongue (ou virus de La fièvre catarrhale ovine) qui affecte principalement les ruminants (Falconi et al., 2011).

Divers tentatives de mise en évidence de l'implication des Ceratopogonidae dans la transmission d'hémosporidies en milieux cavernicoles n'ont pas donné de résultats concluants. Cependant diverses études ont suggéré d'approfondir les recherches du fait de leur rôle de vecteur en milieu épigé, et au regard de leur abondance dans les gîtes cavernicoles de chauves-souris qui sont les hôtes naturels d'*Hepaticocystis* et de *Nycteria* (Adam, 1974a, c). A ce jour, l'implication des Ceratopogonidae dans la transmission de virus de vertébrés cavernicoles demeure encore faiblement documentée, simplement comme conséquence du peu d'étude en général sur cette famille de Diptères en milieux hypogés. Ceci paraît surprenant surtout du fait de la présence dans ces milieux de chauves-souris reconnues comme des réservoirs pour de nombreux virus (Anti et al., 2015b).

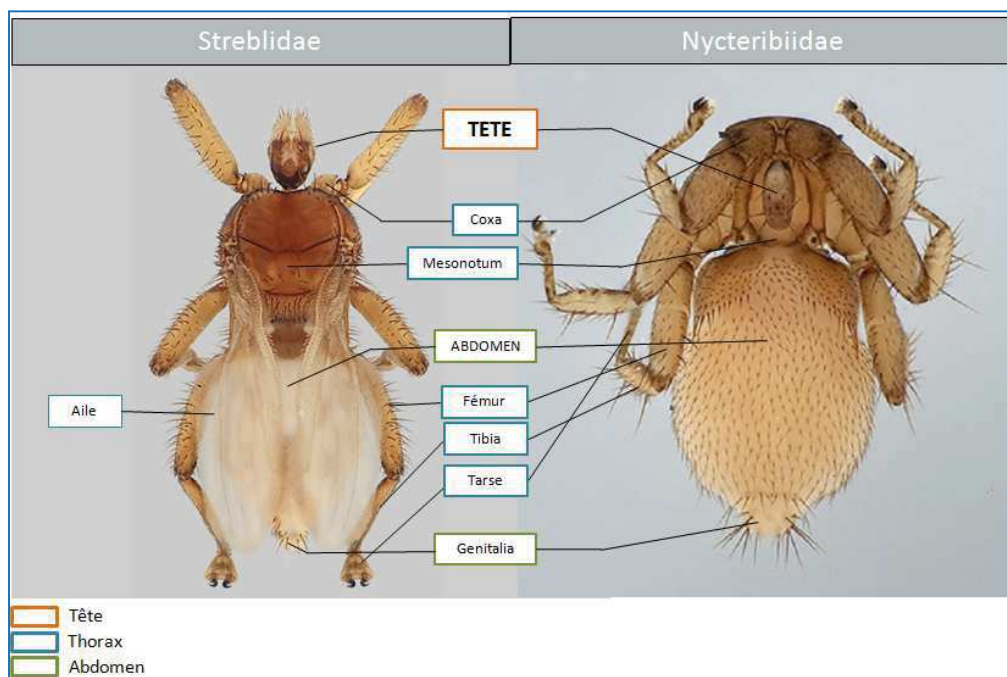
## **2.2.4. Ectoparasites de chauves-souris : Nycteribiidae et Streblidae**

### **2.2.4.1. Morphologie générale**

Les insectes des familles des Nycteribiidae et Streblidae (Figure 16) sont des diptères ectoparasites obligatoires et exclusifs de chauves-souris. Ces mouches, d'une taille de 1 à 5 mm en moyenne, possèdent des adaptations morpho-anatomiques leur



conférant l'apparence de petites araignées. La tête de forme latéralement subsphérique ou dorso-ventralement aplatie, est presque entièrement sclérifiée sur les parties dorsales et latérales. En revanche les parties antérieures et ventrales de la tête sont membraneuses. Le vertex porte des rangées de soies sur sa marge antérieure. Certaines espèces sont pourvues d'yeux, pigmentés ou non, tandis que d'autres en sont totalement dépourvues. Les antennes sont constituées de deux segments dont le second (segment apical) est invaginé dans le premier (segment basal). Les palpes maxillaires sont d'aspect segmenté, variablement aplatis et recouverts de soies dont le nombre et la longueur varie en fonction des différents taxons constituant ces deux familles. Le proboscis est large sur la partie basale et fin sur son extrémité apicale.



**Figure 16** : Morphologie des Nycteribiidae et Streblidae. Images extraites de (Dick and Dittmar, 2014)

Le corps est recouvert de plaques sclérifiées séparées par des tissus membraneux. Au cours de l'évolution, le mésothorax et le métathorax ont fusionné pour ne former qu'une grande plaque en grande partie sclérifiée, avec quelques plages membraneuses. Le prothorax, y compris le prosternum, forment une structure reposant entre la



région de la surface dorsale entourant l'insertion de la tête et la coxa antérieure. Les Streblidae possèdent une paire d'ailes (qui peuvent être de taille normale, réduite, voire absentes), qui lorsqu'elles sont fonctionnelles, permettent des vols courts (de l'ordre du mètre). En revanche les Nycteribiidae sont toujours dépourvus d'ailes. La face dorsale du thorax est en grande partie membraneuse, portant par endroit des plaques sclérifiées. En fonction des taxons, les haltères peuvent être visibles, ou non quand ceux-ci sont recouverts par une couche membraneuse. Les pattes sont formées de segments plus ou moins trapus et recouverts de nombreuses soies. Les coxa sont généralement courtes en forme d'anneaux. Les fémurs sont bien développés et marqués d'un anneau pâle sur leur extrémité basale. Les tibias peuvent être fortement comprimés latéralement avec une abondance de soies sur leur face ventrale, ou avoir un aspect longiligne marqués par deux à trois anneaux sur leur région centrale. Les tarse sont constitués de plusieurs tarsomères aussi longs que larges, avec le tarsomère apical portant de forts crochets bien individualisés. L'abdomen est recouvert de tissus membraneux sur la majeure partie de sa surface, à l'exception des segments abdominaux postérieurs sclérifiés (tergites et sternites). Chez les mâles, l'organe copulatoire est rétracté dans l'abdomen au repos.

#### **2.2.4.2. Position taxonomique**

Les Nycteribiidae et Streblidae sont des pupipares et forment avec les Glossinidae (mouches tsé-tsé) et les Hippoboscidae (dont certains sont des ectoparasites d'oiseaux), une même lignée monophylétique correspondant à la superfamille des Hippoboscoidea. Des études montrent que les mouches pupipares sont au sein des diptères les plus isolées phylogénétiquement (Yeates and Wiegmann, 1999).

Les Nycteribiidae sont subdivisés en deux principales sous-familles, les Nycteribiinae et les Cyclopodinae. A ce jour, les Nycteribiinae regroupent 9 genres et

210 espèces décrites avec une large répartition géographique à travers le monde. Ils sont retrouvés dans l'Ancien et le Nouveau Monde, avec un taux d'endémicité bien marqué pour certaines espèces. Ils sont connus pour parasiter uniquement les chauves-souris insectivores. Les Cyclopodinae quant à eux, forment un ensemble de 5 genres et 65 espèces. Contrairement aux Nycteribiinae, ils ne sont retrouvés que dans l'Ancien Monde et ne parasitent que des chauve-souris frugivores (Dick and Patterson, 2006; Theodor, 1967).

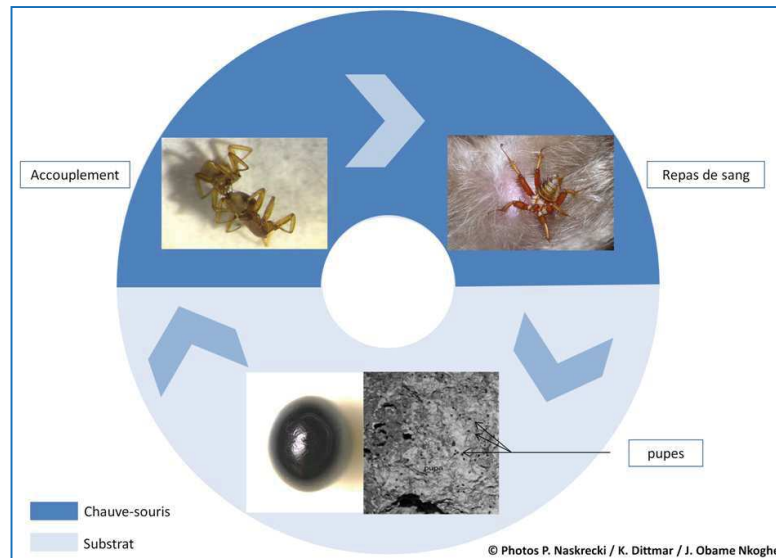
En Afrique, 38 espèces de Nycteribiidae issues de 7 genres (*Nycteribia*, *Basilina*, *Tripselia*, *Penicillidia*, *Eucampsipoda*, *Dipseliopoda* et *Cyclopodia*) sont connus. Elles ont, pour l'essentiel, été décrites à partir de spécimens collectés de chauve-souris en Afrique subsaharienne (Theodor, 1957).

Les Streblidae, retrouvés sur tous les continents, sont subdivisés en cinq sous-familles : Streblinae, Ascodipterinae, Nycteriboscinae, Nycterophiliinae et Trichobiinae. Dans l'Ancien Monde, on compte 65 espèces appartenant aux deux sous-familles des Nycteriboscinae et Ascodipterinae. Dans le Nouveau Monde, 94 espèces sont répertoriées parmi les sous-familles des Streblinae, Nycterophiliinae et Trichobiinae (Theodor, 1968). Cependant avec plus d'une trentaine d'espèces recensées, les Nycteriboscinae (genres : *Brachytarsina*, *Raymondia* et *Raymondioides*) et les Ascodipterinae (unique genre : *Ascodipteron*) constituent les principales sous-familles parasitant les chauve-souris africaines. En Afrique, les Nycteriboscinae sont représentés par 33 espèces regroupés en 3 genres, à savoir *Brachytarsina* (5 espèces), *Raymondia* (27 espèces) et *Raymondioides* (une espèce). Concernant la sous-famille des Ascodipterinae, seules 10 espèces du genre *Ascodipteron*, sont connues à ce jour (Theodor, 1968).

### 2.2.4.3. Cycle biologique

Les ectoparasites de chauves souris sont strictement hémato-phages dans les deux sexes (Dick and Patterson, 2006). Ils passent l'essentiel de leur vie d'adulte sur leur hôte. De nos jours encore, leur biologie reproductive demeure mal connue. Cependant des généralisations (Figure 18) sont tirées sur la base de quelques observations menées sur un nombre restreint d'espèces ayant fait l'objet d'études bio-écologiques (Marshall, 1970). Les Nycteribiidae et les Streblidae sont pupipares vivipares (Hagan, 1951). Les œufs sont fécondés dans l'utérus de la femelle et ne se développent au stade larvaire puis pupal que par cycle d'un œuf à la fois. Ainsi l'œuf fécondé évolue en larve au sein de la femelle. Cette dernière est nourrie via des glandes lactifères intra-utérines. A la suite de deux mues, la larve évolue au stade 3 (L3). Par la suite la femelle gravide quitte son hôte pour libérer la L3 (larviposition) qu'elle dépose sur le substrat où nichent les chauves-souris hôtes. Après sa libération, la L3 évolue instantanément en une puppe, qui donnera une mouche adulte au bout 25 à 40 jours en fonction des espèces et des conditions environnementales (Marshall, 1970).

Après émergence, l'adulte se met à la recherche d'un hôte, sur lequel mâles et femelles s'accoupleront pour donner lieu à la génération suivante. Des observations réalisées chez certaines espèces ont montré que les ectoparasites atteignent leur maturité sexuelle entre cinq et six jours après leur émergence. De façon générale, un seul accouplement est suffisant pour assurer la descendance grâce au stockage des spermatozoïdes dans les spermathèques des femelles, mais les mâles s'accouplent très souvent avec les femelles immédiatement après que celles-ci aient libéré la L3, ou alors avec des femelles ténérales, c'est-à-dire ayant fraîchement émergé et ne s'étant pas encore nourries de sang.



**Figure 17** : Cycle de reproduction des Nycteribiidae et Streblidae.

L'accouplement se déroule sur la chauve-souris, ainsi que toute la période gravide des femelles. La larve est déposée à même le substrat puis s'ensuit la pupaison. La pupe demeure fixée au substrat jusqu'à l'émergence de l'adulte.

Les Nycteribiidae et les Streblidae affichent une spécificité obligatoire vis-à-vis de leurs hôtes chauves-souris (Wenzel and Tripton, 1966). Cette spécificité est telle que leur vie en l'absence des chauves-souris pendant une trentaine d'heures peut s'avérer létale pour les adultes. Ces mouches sont également caractérisées par une préférence d'hôtes très marquée, soit pour une espèce de chauves-souris ou soit pour plusieurs espèces proches phylogénétiquement (Dick and Patterson, 2007). Ainsi la présence de certaines espèces de chauves-souris dans un milieu donné, donnerait une connaissance *a priori* des espèces de Nycteribiidae et de Streblidae potentiellement en circulation dans ce milieu.

#### 2.2.4.4. Les Nycteribiidae et Streblidae des grottes d'Afrique

A ce jour, peu de données publiées et accessibles existent sur la circulation, la biologie et l'écologie d'ectoparasites de chauve-souris en milieux cavernicoles en Afrique. La recherche de divers réservoirs sauvages d'agents infectieux a conduit de

nombreux chercheurs à s'intéresser aux chiroptères et aux cycles des agents infectieux qu'ils hébergent. Plusieurs de ces études ont concerné des chauve-souris cavernicoles (Adam, 1973b, 1974a; Landau and Adam, 1973) et les insectes hémato-phages vecteurs potentiels de la famille des Culicidae, Phlebotominae et Ceratopogonidae, mais très peu d'entre-elles se sont intéressées au rôle vecteur des Nycteribiidae et les Streblidae parasitant les chauve-souris en milieu cavernicole. Les rares études à s'être intéressées aux ectoparasites de chauves-souris en milieux cavernicoles ont pour la plupart été menées sur le continent Sud Américain (Dittmar et al., 2009; Morse et al., 2012a).

#### **2.2.4.5. Implication dans la transmission d'agents infectieux**

Après les anophèles, les ectoparasites de chauves-souris sont parmi les vecteurs d'hémosporidies les plus connus. Le rôle des Nycteribiidae dans la transmission des parasites du genre *Polychromophilus* a été mis en évidence pour la première fois hors d'Afrique, chez une chauve-souris du genre *Myotis* en Palestine (Mer and Goldblum, 1947). Des investigations ultérieures ont montré le rôle de l'espèce *Penicillidia fulvida* Bigot comme vecteur principal des *Polychromophilus* (Landau and Adam, 1973). Les principales chauves-souris hôtes de *Polychromophilus* connues appartiennent au genres *Miniopterus*, *Rhinolophus*, *Myotis*, *Pipistrellus*, *Hipposideros*, *Antrozous* et *Glosophaga* (Adam, 1974a). Plusieurs de ces espèces sont rencontrées dans les grottes d'Afrique tropicale, en particulier *Miniopterus minor minor* Peters, *Rhinolophus sylvestris* Aellen et *Hipposideros caffer* Sundevall, connues pour être infectées en toutes saisons (Adam and Landau, 1973a-b). A l'heure actuelle, les Streblidae n'ont jamais été incriminés dans la transmission d'hémosporidies de chiroptères. Néanmoins, un intérêt devrait être porté sur ces derniers dans la mesure où une étude

récente a révélé la présence d'hémosporidies (au stade d'oocyste et sporozoïtes) dans des spécimens fossilisés de Streblidae (Poinar, 2011).

Si l'implication des ectoparasites de chiroptères dans la transmission d'hémosporidies est avérée, leur implication dans la transmission d'arbovirus reste encore à explorer. Il semble donc particulièrement intéressant d'entreprendre des investigations sur leur potentielle implication dans les cycles naturels de virus infectant les chauves-souris, en particulier les cavernicoles, au regard du potentiel avéré des Hippoboscoidae à assurer la transmission de certains virus infectant les mammifères à l'exemple du virus West Nile (Farajollahi et al., 2005).

### **2.3. Autres arthropodes hématophages cavernicoles**

Dans la région afrotropicale les moustiques, les phlébotomes et les cératopogonides sont les groupes ayant le plus suscité de l'intérêt dans l'étude des arthropodes hématophages, notamment de leur implication dans la transmission d'agents infectieux. Le contexte des émergences d'agents infectieux zoonotiques en Afrique, et en particulier en Afrique Centrale et la présence de nombreuses espèces de diptères hématophages dits « libres », donc ayant une grande capacité de dispersion, nous ont conduit à nous focaliser particulièrement sur ces groupes. Cependant, d'autres groupes d'arthropodes hématophages, par ailleurs connus pour leur importance médico-vétérinaire, sont présents dans les grottes. Parmi ces derniers, nous pouvons citer les puces, les punaises et les tiques. Bien que notre étude ne se focalise pas sur ces derniers, il est important de noter leur participation éventuelle dans le paysage écologique vectoriel des écosystèmes cavernicoles.

#### **2.3.1. Les Puces**

Les puces sont des ectoparasites appartenant à l'ordre des Siphonaptères. Ce sont des insectes de forme aplatie latéralement et de taille variant de 1 à 8mm. Les puces

possèdent un corps très chitinisé d'apparence massive due à la séparation peu nette entre la tête, le thorax et l'abdomen (Figure 18). Ces insectes aptères sont spécialement caractérisés par une tête de forme carénée portant de courts palpes et des pièces buccales perforantes. Le thorax est caractérisé par la présence d'une troisième paire de pattes très développée adaptée au saut. L'abdomen est formé de 10 segments dont les 8ème et 9èmes portent respectivement les génitalia (organes reproducteurs) femelles et mâles. Ces insectes vivent en contact étroit avec leurs hôtes vertébrés, généralement pourvus d'un abris (hommes, oiseaux, animaux carnivores, chauves-souris, etc.), dont ils sont pleinement dépendant (Rodhain and Perez, 1985). Ces insectes vivent en contact étroit avec leurs hôtes vertébrés, généralement pourvus d'un abris (hommes, oiseaux, animaux carnivores, chauves-souris, etc.), dont ils sont pleinement dépendant (Rodhain and Perez, 1985). Ils parasitent leurs hôtes de façon intermittente mais régulière afin de s'assurer un apport sanguin constant. Les œufs, de couleur blanche ou jaune, sont d'une forme ovale et mesurent moins d'un millimètre. Les formes larvaires des puces, d'aspect vermiformes et pouvant mesurer de 3 à 5mm, vivent et se nourrissent sur le substrat (gîte de l'hôte) et évoluent en nymphes qui demeurent immobiles jusqu'à l'émergence des formes adultes au bout de 8 à 10 jours (ANOFEL, 2014). Chez ces insectes, la nymphe peut entrer en diapause, particulièrement en l'absence d'hôtes.



**Figure 18** : Photo Siphonaptère (puce)

L'émergence au stade adulte est ainsi déclenché par divers stimuli tel que la chaleur, les vibrations du sol, ou de l'air environnant. Les puces comprennent plusieurs milliers d'espèces, dans plus de 200 genres et 17 familles. Les genres *Pulex*, *Xenopsylla* et *Ctenocephalides* figurent parmi les plus connus.

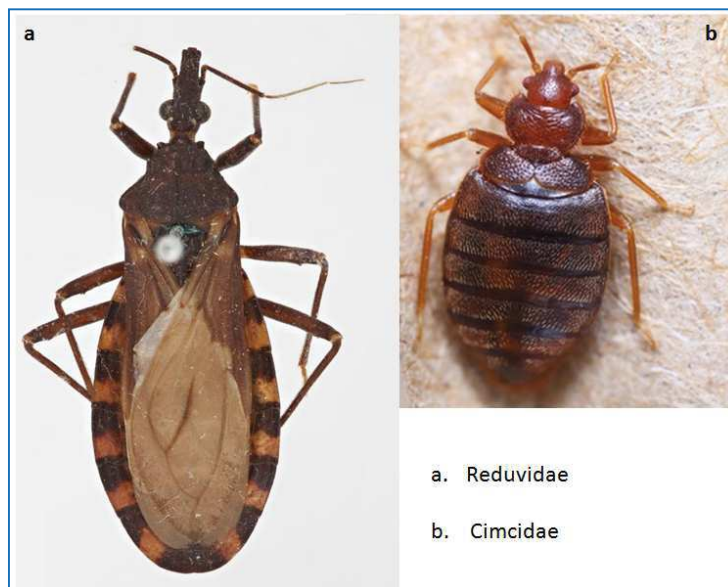
Les puces sont connues pour être impliquées dans la transmission de divers agents infectieux. Elle transmettent notamment des rickettsies, à l'exemple de *Rickettsia typhi* Wolbach et Todd, responsable du typhus murin chez diverses espèces de rongeurs, affectant parfois l'homme ; et d'autres bactéries, comme le bacille de la tularémie (*Francisella tularensis* McCoy et Chapin), des bartonelles infectant l'homme, la faune domestique ou sauvage, ou encore le bacille de la peste (*Yersinia pestis* Yersin ayant causé de nombreux ravages en santé humaine) ; des trypanosomes comme par exemple *Trypanosoma lewisi* Kent infectant les rongeurs ; et enfin occasionnellement des virus, à l'instar du virus de la myxomatose du lièvre (Rodhain and Perez, 1985). Ces insectes sont retrouvés aussi bien en milieux épigés que dans les environnements cavernicoles, à travers le monde et en particulier dans la région afrotropicale (Brook et al., 2015; Gomez et al., 2013).

### 2.3.2. Les Punaises

Les punaises sont des insectes appartenant à l'ordre des Hémiptères. Ce sont, pour une grande partie d'entre eux des insectes parasites de plantes, qui se nourrissent, pour la plupart, de sève. Cependant deux familles, les Reduviidae et les Cimicidae (Figure 19), appartenant toutes deux au sous-ordre des Hétéroptères, revêtent une importance en santé humaine et animale car elles comportent des espèces hématophages.



Les Cimicidae, mesurant de 4 à 6mm, sont des punaises de petite taille, ayant une forme aplaties dorso-ventralement. Ils présentent une tête très aplatie, portant une paire d'yeux composés et une paire d'antennes fines formées de quatre articles, ainsi que des pièces buccales de types piqueur-suceur qui se rabattent sous le corps de l'insecte au repos. Ces insectes sont dépourvus d'ailes fonctionnelles, la première paire étant réduite à de simples écailles, tandis que la deuxième ayant totalement disparu.



**Figure 19** : Hétéroptères (réduve et punaise)

Les Cimicidae ont la particularité d'avoir un thorax large au niveau du prothorax et un mésothorax présentant un scutellum de forme triangulaire, le métathorax étant recouvert par les ailes vestigiales. Les tarses présentent des longueurs variables en fonction des unités taxonomiques. Cependant elles sont caractérisées par trois tarsomères, dont le plus apicale porte une paire de griffes. D'aspect ovale, l'abdomen des Cimicidae comporte une série de 11 segments. Chez le mâle, l'organe reproducteur a une forme asymétrique constitué d'un spicule tourné vers la gauche. Chez les femelles le génitalia se présente sous la forme d'un réceptacle latéral localisé sur le côté droit de sa face ventrale dans lequel le mâle y dépose le sperme après la perforation de la paroi abdominale (Rodhain and Perez, 1985).

Les Reduviidae constituent la deuxième famille d'Hétéroptères ayant un intérêt médical et vétérinaire. Dans cette famille, seule les membres de la sous-famille des Triatominae comportent des espèces hématophages. Les Reduviidae sont des punaises de grande taille comparativement aux Cimicidae. Ces insectes se reconnaissent généralement par leur ornementation caractérisée par une alternance des couleurs rouge, brun et noir. Leur aspect physique généralement longiligne est accentué par la forme allongée de leur tête et leur abdomen. Les Reduviidae portent au niveau de leur tête une paire d'yeux composés de grand volume et une paire d'antennes longues formées de quatre segments antennaires. Comme pour les Cimicidae, les pièces buccales des Reduviidae sont de type piqueur-suceur et sont retournées sur la face ventrale de l'insecte au repos. Le thorax présente un premier segment (prothorax) visible en forme trapézoïde, suivi du mésothorax de forme triangulaire et du métathorax étant dissimulés sous les ailes. Les ailes sont au nombre de deux paires : la première, rigide et vestigiale, couvre la seconde membraneuse, utilisée pour le vol. Le thorax porte trois paires de pattes avec des tarsi portant une paire de griffes sur les tarsomères apicaux. L'abdomen est de forme allongée et est aplati dorso-ventralement et porte les organes reproducteurs.

Chez les Cimicidae comme les Reduviidae, les œufs, d'aspect ovales, sont pondus en lot de plusieurs dizaines et restent fixés au substrat. Les formes larvaires et nymphales sont semblables aux formes adultes, la différence étant simplement liée à la taille (les larves sont plus petites que les nymphes, elles-mêmes plus petites que les adultes). Les Cimicidae atteignent leur stade adulte au bout de 6 à 9 semaines. Chez ces insectes tous les stades de développement, sauf l'œuf, sont hématophages, se nourrissant préférentiellement sur des vertébrés, notamment les humains, les oiseaux et les chauves-souris (Reinhardt and Siva-Jothy, 2007). Bien que les Cimicidae aient souvent été suspectés d'être impliqués dans la transmission de nombreux agents infectieux (Ryckman et al., 1981), leur rôle comme vecteur n'a que rarement été

démontré en conditions naturelles (Delaunay et al., 2011). Cependant quelques espèces ont été identifiées comme des vecteurs de virus, à l'exemple de *Oeciacus vicarius* Horvath, vecteur naturel d'un Alphavirus (Fort Morgan Virus) sur le continent américain (Rush et al., 1980) ; ou de l'espèce *Cimex lectularius*, décrite comme une espèce vectrice de *Trypanosoma cruzi* Chagas, l'agent responsable de la trypanosomiase américaine (maladie de Chagas) (Salazar et al., 2015). Contrairement aux Cimicidae, le rôle vectoriel des Reduviidae, en particulier des Triatominae, est plus largement documenté. L'exemple le plus frappant est sans doute celui qui concerne la transmission de *Trypanosoma cruzi*, (Rodhain and Perez, 1985). Peu de travaux réalisés sur la transmission de virus par les triatomes permettent de réellement évaluer leur rôle en tant que vecteur d'arboviroses. Cependant, quelques études font état d'isollements de virus tels que le virus de l'encéphalite équine de l'ouest ou celui de l'encéphalite équine vénézuélienne (Divo and Benavides, 1978). Les punaises, aussi bien les Cimicidae que les Reduviidae, sont des insectes qui colonisent divers types d'écosystèmes et que l'on retrouve aussi bien en milieux épigés que dans les écosystèmes cavernicoles.

### 2.3.3. Les tiques

Les tiques sont des acariens hématophages regroupés au sein de la classe des arachnides. Elles sont caractérisées par un nombre de pattes variant de 6 chez les formes larvaires à 8 chez les nymphes et les adultes. Leur morphologie, différente de celle des insectes, s'organise en gnathostome (partie avant du corps portant les pièces buccales), idiosome (partie intermédiaire du corps où s'insèrent les pattes) et opisthosome (partie postérieure du corps). Les tiques se subdivisent en deux grandes familles principales: les Ixodidae (tiques dures) et les Argasidae (tiques moles). Elles ont une répartition géographique mondiale et colonisent tous les écosystèmes propres à l'existence animale. Les tiques sont des ectoparasites semi-permanents qui vivent

fondamentalement aux dépens de leurs hôtes vertébrés, l'homme n'étant qu'un hôte accidentel. Concernant leur importance médico-vétérinaire, les tiques sont surtout connues pour leur implication dans la transmission des rickettsioses, telles que *Rickettsia conorii* Brumpt connue pour affecter l'homme en Afrique, sur le pourtour méditerranéen et en Asie (Rodhain and Perez, 1985). En plus des rickettsies, les tiques sont impliquées dans la transmission de borrelioses et de parasitoses telles que les babésioses en Europe et en Afrique (Gunders and Hadini, 1974; Rodhain and Perez, 1985). Les tiques sont également impliquées dans la transmission d'arboviroses, notamment divers encéphalites à tiques (ex : Encéphalite à tiques, TBE), les fièvres à tiques (ex : fièvre à virus Dugbe en Afrique), les fièvres hémorragiques à tiques (ex : Crimée-Congo en Afrique) (Rodhain and Perez, 1985). Bien que les tiques soient bien connues en milieux épigés, où leur rôle de vecteurs de pathogènes a été démontré, elles demeurent à ce jour peu investiguées en milieux cavernicoles, et leur implication dans la transmission d'agents infectieux dans ces milieux reste à démontrer.

## **2.4. Connaissances actuelles de l'entomofaune hémato-phage cavernicole du Gabon**

### **2.4.1. Les grottes du Gabon**

Le Gabon, avec ses 267 667 kilomètres carrés, est recouvert à 85% de forêts qui abritent d'immenses réseaux souterrains. La structure des grandes régions sédimentaires du sous-sol gabonais a permis, grâce au phénomène d'érosion, la formation d'environnements karstiques et pseudo-karstiques répartis dans quatre grands domaines géologiques (Figure 20). Il s'agit notamment : 1) du bassin sédimentaire côtier (formé du Jurassique supérieur jusqu'au Miocène), abritant les grottes du Fernan-Vaz (Ouest du Gabon), dont les plus connues et récemment

découvertes sont les grottes de la région d'Abanda, dénombrées à une quinzaine ; 2) du grand synclinal de la Nyanga (Précambrien supérieur) dans le Sud du Gabon. Les spéléologues et biologistes ayant exploré ces cavités, dans les régions de Tchibanga, Lébamba et Ndendé, ont pu rapporter l'existence de 27 grottes représentant un total de 6,53 km de réseaux souterrains. Parmi ces cavités, celles de Tsona, Bongolo, et de Mbenaltembe figurent parmi les plus connues ; 3) du bassin sédimentaire Francevillien (Précambrien moyen), abritant les grottes des régions de Franceville, d'Okondja et de Lastoursville (Centre et Sud-Est du Gabon), où plus d'une quarantaine de grottes sont signalées ; et 4) des monts de la forêt de Bélinga (Précambrien inférieur), abritant près d'une dizaine de grottes recensées (Arribart et al., 2007; Bourgarel, 2009; Delorme, 1979; Frost and Testa, 2009; Oslisly et al., 1994; Peyrot and Massala, 1987; Strinati, 1960). De ces différents grands domaines géologiques, les trois premiers offrent des conditions hautement favorables au creusement de grottes, car constitués de roches facilement érodables (roches dolomitiques et schisto-calcaires) (Oslisly, 2007; Testa and Oslisly, 2013). En effet, durant les saisons pluvieuses, les épisodes torrentiels sont fréquents. Le volume d'eau s'infiltrant dans les karsts érode continuellement les formations calcaires, conduisant ainsi à la formation des réseaux souterrains recensés en grand nombre dans ces régions. Le quatrième grand domaine géologique, moins propice à un creusement karstique, est formé de roches vieilles, d'origine volcanique, plutonique et sédimentaire ayant connu plusieurs phases tectoniques et métamorphiques (Delorme, 1979).

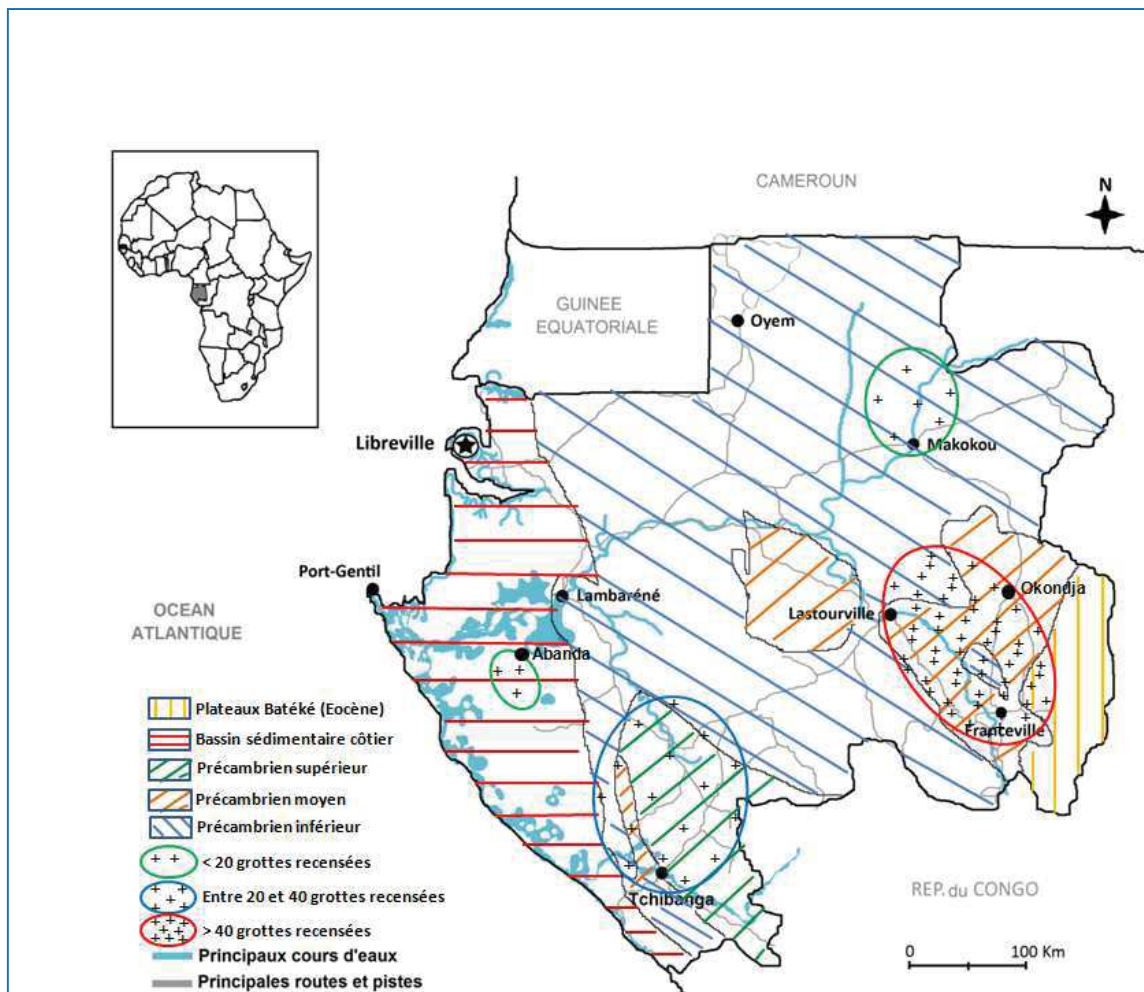


Figure 20 : Distribution des grottes actuellement recensées au Gabon

Ces roches vieilles sont constituées essentiellement des gneiss, granito-gneiss, et de séries de cuirasses latéritiques à tendance schisteuse où le métamorphisme est moins violent. Ce sont ces zones de faible métamorphisme, dites « tendres », qui sont à l'origine de la formation des quelques grottes recensées dans cette région du Gabon, dont le creusement est d'origine biologique (Delorme, 1979; Vattier-Bernard and Adam, 1966a). En effet, l'eau présente dans les cavités, rendue suffisamment acide par l'abondance de guano de chauves souris, attaque et creuse les roches ferrugineuses par érosion hydro-chimique, qui au fil du temps se transforme en véritables grottes. D'après les différents auteurs ayant prospecté les cavités du Gabon, il en existerait au moins 92 dont la majorité reste encore à topographier (Figure 20). D'après les

diverses conclusions, il existerait donc encore plusieurs dizaines de grottes à découvrir, avec de fortes probabilités dans la région du synclinal schisto-calcaire de la Nyanga et la région de Lastoursville.

#### **2.4.2. Etat des lieux des recherches sur la faune entomologique cavernicole**

Si les insectes hématophages cavernicoles du Congo-Brazzaville sont bien documentés, ce n'est pas le cas dans les autres pays d'Afrique, et en particulier au Gabon. De façon très contrastée avec la diversité d'environnements cavernicoles présents et recensés dans ce pays, très peu d'informations sont disponibles sur la faune qui y vit. Bien que certaines grottes soient peu accessibles, un grand nombre d'entre-elles, généralement exploitées par les populations locales, présente des facilités d'accès permettant leur exploration et des études bio-écologiques. Malgré cela, les données relatives à la faune entomologique demeurent parcellaires, voire quasi-inexistantes quand il s'agit de la fraction hématophage. L'essentiel des données accessibles se résume à l'observation de quelques espèces de Culicidae (complexe *An. smithii* ; *Uranotaenia nigromaculata* ; *Culex* sp.), de Phlebotominae (*Spelaeophlebotomus gigas*), de Ceratopogonidae (*Culicoides brosetti*) et de Streblidae par Adam et ses collaborateurs au cours d'une mission ponctuelle réalisée dans trois grottes de la forêt de Bélinga (Adam, 1966; Vattier-Bernard and Adam, 1966a). Ces données sont toutefois un point de départ intéressant pour étudier en profondeur la diversité des espèces qui y prolifèrent.





## Chapitre 3

# Défis futurs et objectifs

*Ce chapitre présente les grandes problématiques abordées dans cette thèse. Il fournit des éléments de compréhension du phénomène d'émergence de pathogènes zoonotiques et de ses causes. Dans un second temps, il met en lumière les différents acteurs entrant dans le processus de l'émergence et le rôle prépondérant des chauves-souris comme des réservoirs potentiels dans les milieux cavernicoles. Enfin, après avoir exposé la problématique de l'émergence zoonotique associée aux milieux cavernicoles du Gabon et les défis actuels qui y sont associés, le chapitre introduit les principaux objectifs de ce travail et le contenu du mémoire expérimental.*



Photo : Judicaël Obame Nkoghe

### 3.1. Le phénomène d'émergence zoonotique et ses causes

De récentes estimations ont suggéré que les maladies infectieuses étaient annuellement responsables de la mort de 14 millions de personnes à travers le monde (Keller, 2012). D'autres soulignent que près de 60% des agents pathogènes pour l'homme ont une origine animale et que plus de 75% des maladies infectieuses émergentes pouvant toucher l'homme sont également d'origine animale (Culter et al., 2010; OHI, 2014; OIE, 2015). Ce sont des « zoonoses ». Une maladie infectieuse zoonotique émergente ou ré-émergente peut se définir ainsi comme une infection d'origine animale dont l'incidence chez les populations humaines a augmenté au cours d'une période de temps donnée ou dont le risque d'augmentation de l'incidence dans un futur proche est une évidence (Aubry, 2015). Une grande partie de ces maladies trouve son origine dans la faune sauvage. Ces infections sont aussi anciennes que l'humanité. Cependant le renouveau des maladies infectieuses qui en découlent, notamment les nouvelles maladies transmissibles, tout comme la réémergence de maladies « anciennes », est accentué par les progrès techniques qui permettent de mieux détecter et de caractériser les agents infectieux. Ces infections constituent une réelle menace pour la santé publique, qu'il s'agisse d'agents infectieux non identifiés antérieurement, ou d'agent infectieux déjà identifiés mais ayant subi des mutations et une évolution leur permettant d'atteindre de nouvelles populations, de nouvelles espèces ou de nouvelles aires de répartition (Lesage, 2014).

Les mécanismes de l'émergence sont de divers ordres. En fonction du type de pathogène, de sa virulence, de la durée d'incubation ou de sa persistance dans l'environnement, il existe des pathogènes capable : 1) uniquement d'infections primaires, c'est-à-dire d'une transmission du réservoir animal à l'homme sans possibilité de transmission extensive interhumaine. C'est par exemple le cas de l'infection par virus du West Nile ; 2) d'infections primaires et secondaires, du

réservoir animal à l'homme avec en plus une possibilité de transmission extensive d'un homme à un autre. C'est par exemple le cas des virus à symptômes grippaux. Ces infections secondaires peuvent même être très extensives, avec une transmission interhumaine très large sur plusieurs cycles, à l'instar des virus hémorragiques tel qu'Ebola. Bien que la propagation de ces infections entre les réservoirs animaux et les hommes puisse se faire de façon directe par contact avec les animaux réservoirs ou leurs fluides biologiques, elle peut également se faire de façon indirecte *via* une voie passive (air, eau, alimentation) ou active (transmission vectorielle). De façon générale, le processus de l'émergence d'un agent infectieux zoonotique commence par un ou quelques cas sporadiques (au cours d'une même fenêtre temporelle), puis se poursuit par une dissémination créant des foyers secondaires au sein de populations immunologiquement naïves. Cette dissémination peut être très localisée ou alors prendre une ampleur géographique importante.

Les phénomènes d'émergence d'agents infectieux sont favorisés par plusieurs facteurs (très souvent à dominante anthropique) à une échelle mondiale (mondialisation des échanges, changements climatiques, ...), régionale ou locale. A une échelle locale ou régionale, 1) l'existence de contacts rapprochés entre les animaux, en particulier les animaux sauvages, et les hommes ; 2) la modification des écosystèmes par la déforestation, des aménagements d'intérêt publique (irrigation, création de voies de communication terrestres) ; 3) la création de zones périphériques suburbaines mal assainies ; 4) le manque de vigilance sur la veille sanitaire ou les systèmes de contrôle aux frontières des états ; 5) le développement grandissant de l'écotourisme ; ou 6) les conflits territoriaux ou politiques entraînant des mouvements de populations et une désorganisation des systèmes sanitaires et des programmes médicaux jouent un rôle indéniable dans les processus d'émergence. Les risques liés à ces facteurs tendent à croître progressivement, en particulier dans les zones tropicales, où se produisent près de trois quarts des contaminations zoonotiques (Jones et al.,

2008). A une échelle globale, les phénomènes d'émergence de maladies sont hautement favorisés par une mondialisation de plus en plus intensifiée des échanges et des flux migratoires des populations humaines.

Les infections zoonotiques émergentes ont plusieurs origines étiologiques, notamment bactérienne, fongique, parasitaire ou virale. Si ces agents infectieux vivent en état d'équilibre avec leurs hôtes naturels, il n'en est pas de même avec l'homme qui généralement est un hôte accidentel et souvent non préparé immunologiquement. Ces agents infectieux ont leurs réservoirs naturels parmi plusieurs classes d'animaux vertébrés. En zones tropicales, où la biodiversité est la plus riche, les chauves-souris représentent les réservoirs les plus importants au regard du très grand nombre d'agents infectieux qu'elles hébergent et de leur potentiel de dispersion très élevé (Wibbelt et al., 2010).

### **3.2. Les chauves-souris : réservoirs privilégiés des milieux hypogés**

En milieux cavernicoles, les chauves-souris constituent l'un des groupes les plus importants par leur capacité à héberger un grand nombre d'agents infectieux, devant les rongeurs, les oiseaux, les reptiles et divers autres mammifères fréquentant occasionnellement les grottes (ACR, 2014). Avec plus de 340 espèces, le continent Africain héberge plus du tiers des espèces de chauves-souris du monde entier (ACR, 2014). D'une part, elles forment des colonies de plusieurs centaines de milliers d'individus vivant dans des conditions de promiscuité hautement favorables à la transmission d'agents infectieux. D'autre part ces chauves-souris hébergent une très large gamme d'agents infectieux zoonotiques et potentiellement zoonotiques (Hayman et al., 2013). Elles sont les hôtes de nombreux virus, et en particulier d'arbovirus (Coulanges et al., 1974; Williams et al., 1964) appartenant principalement aux familles des Flaviviridae, Rhabdoviridae, Reoviridae, Bunyaviridae, Togaviridae, Paramyxoviridae et Coronaviridae (Calisher et al., 2006; Chen et al., 2014). Un grand

nombre d'entre eux a fait l'objet d'isolements chez divers espèces de chauves-souris dont certaines appartenant aux genres *Rousettus*, *Hipposideros*, *Eidolon*, *Rhinolophus*, *Nycteris*, à travers plusieurs pays d'Afrique (Cameroun, Sénégal, République Centrafricaine, Guinée, Uganda, etc.) (Tableau II).

En dehors des virus, les chauves-souris sont également connues pour héberger diverses espèces de parasites hématozoaires (Adam, 1973b). Ces parasites appartiennent principalement aux genres *Plasmodium* (Adam and Landau, 1970 ; Leleup, 1956; Lips, 1960 ), *Nycteria* (Rosin et al., 1978; Schaer et al., 2015), *Hepaticocystis* (Olival et al., 2013) et *Polychromophilus* (Adam, 1973b; Adam and Landau, 1973b; Landau and Adam, 1973). Ils ont été mis en évidence chez des espèces de chauves-souris appartenant aux genres *Lissonycteris*, *Rousettus*, *Rhinolophus*, *Nycteris*, *Hipposideros*, *Taphozous* et *Megaderma* à travers plusieurs pays, notamment au Congo-Brazzaville, République Démocratique du Congo, Gabon, Soudan, Kenya et Sierra Leone. La transmission de l'ensemble de ces virus et parasites requiert des arthropodes hématophages vecteurs et parmi eux des diptères appartenant aux familles des Culicidae, Ceratopogonidae, Nycteribiidae et Streblidae, et à la sous-famille des Phlebotominae, qui sont considérés comme les groupes de vecteurs potentiellement les plus importants du domaine souterrain.

### 3.3. Défis en cours et futures orientations

En raison de la présence de chauves-souris, considérées parmi les plus grands réservoirs de pathogènes, les grottes demeurent d'un intérêt grandissant pour la communauté scientifique et les autorités en charge de la santé publique. De précédentes études ont montré que les agents pathogènes qui proviennent des chauves-souris peuvent diffuser aisément des chauves-souris vers les humains (Plowright et al., 2015a). Bien que de telles possibilités de transferts ne soient pas encore totalement bien évaluées, les arthropodes cavernicoles pourraient fortement y contribuer et il apparaît dès lors extrêmement intéressant d'estimer un tel risque.

**Tableau II** : Virus isolés de chauves souris en Afrique (d'après (Calisher et al., 2006) et la base de données du CRORA, [www.pasteur.fr/recherche/banques/CRORA](http://www.pasteur.fr/recherche/banques/CRORA))

Familles virales	Genres	Espèces virales	Espèce de chauves-souris	Pays
			<b>Mega-chiroptères</b>	
Reoviridae	<i>Orbivirus</i>	<i>Ife</i> *	<i>Eidolon helvum</i>	Cameroun, RCA
		<i>Fomede</i> *	<i>Rousettus aegyptiacus</i>	Sénégal
		<i>Fomede</i> *	<i>Nycteris nana</i>	Guinée
Herpesviridae	<i>Herpesvirus</i>	<i>Herpes</i> *	<i>Eidolon helvum</i>	Cameroun
Bunyaviridae	<i>Bunyavirus</i>	<i>Yogue</i> *	<i>Rousettus aegyptiacus</i>	RCA, Sénégal
Rhabdoviridae	<i>Rhabdovirus</i>	<i>An B 672 ser. Lag2</i> *	<i>Micropteropus pusillus</i>	RCA
		<i>An D 42443 ser. Lag3</i> *	<i>Eidolon helvum</i>	Sénégal
			<b>Micro-chiroptères</b>	
Togaviridae	<i>Alphavirus</i>	<i>Chikungunya</i> *	<i>Scotophilus sp., Rousettus aegyptiacus</i>	Sénégal
		<i>Sindbis virus</i>	<i>Hipposideros caffer</i>	non précisé
		<i>virus de l'encephalite équine Venezuelan équine</i>	<i>Rhinolophidae sp., Hipposideridae sp.</i>	non précisé
Flaviviridae	<i>Flavivirus</i>	<i>Dakar bat virus</i> *	<i>Scotophilus sp</i>	Sénégal
		<i>Dakar bat virus</i> *	<i>Tadarida sp</i>	RCA, Sénégal
		<i>Bukalasa bat virus</i> *	<i>Tadarida sp</i>	Sénégal
		<i>Dakar bat virus</i> *	<i>Tadarida pumila</i>	Madagascar
		<i>St. Louis encephalitis virus</i>	<i>Tadarida brasiliensis mexicana</i>	non précisé
		<i>Saboya virus</i>	<i>Nycteris gambiensis</i>	non précisé
		<i>Uganda S virus</i> *	<i>Rousettus sp., Tadarida sp.</i>	Uganda
Rhabdoviridae	<i>Rhabdovirus</i>	<i>Gossas</i> *	<i>Tadarida sp</i>	Sénégal
		<i>An K 6909 ser, Lag4</i> *	<i>Nycteris gambiensis</i>	Guinée
Bunyaviridae	<i>Phlebovirus</i>	<i>RVF (Zinga)</i> *	<i>Hipposideros caffer</i>	Guinée
		<i>RVF (Zinga)</i> *	<i>Lavia frons</i>	Guinée
Paramyxoviridae	<i>Henipavirus</i>	<i>Hendra virus</i>	<i>Pteropus alecto,</i> <i>poliocephalus, scapulatus, conspicillatus</i>	non précisé
		<i>Nipah virus</i>	<i>Pteropus hypomelanus, lylei</i>	non précisé
	<i>Rubulavirus</i>	<i>Mapuera virus</i>	<i>Sturnira lilium</i>	non précisé
		<i>Menangle virus</i>	<i>Pteropus poliocephalus</i>	non précisé
	<i>Indéterminé</i>	<i>parainfluenzavirus</i>	<i>Rousettus leschenaultia</i>	non précisé
Coronaviridae	<i>Coronavirus</i>	non précisé	<i>Rhinolophus sinicus, pearsonii, macrotis, ferrumequinum</i>	non précisé

\*: Arbovirus

Comme nous l'avons vu précédemment, nos connaissances sur les Diptères et leur rôle vecteur dans les environnements cavernicoles demeurent encore parcellaires. À l'exception de quelques investigations occasionnelles menées dans une poignée de grottes au Cameroun, en République de Guinée, au Gabon et au Ghana, l'essentiel des connaissances acquises sur les insectes hématophages vivant dans les grottes Afrotropicales reposent principalement sur une série de travaux menés il y a plus de trente ans, durant deux décennies en RDC et au Congo-Brazzaville. Les informations glanées résultent d'efforts importants (difficultés d'accès aux différents sites d'étude, hostilité des milieux, construction de laboratoires souterrains, etc.) consentis par quelques entomologistes passionnés. Les travaux entrepris par ces pionniers n'ont pas

été poursuivis alors que de nombreuses questions restaient irrésolues, notamment celles liées aux cycles de transmission d'agents infectieux. Il y a quelques décennies, il était difficile d'entreprendre la détection de virus dans les environnements cavernicoles à cause de nombreuses limitations techniques, et l'essentiel des parasites protozoaires étaient mis en évidence par des méthodes limitées à la microscopie photonique. Des innovations techniques permettraient certainement de compléter utilement les études réalisées antérieurement, la description de nouvelles espèces d'arthropodes. L'utilisation de la biologie moléculaire, y compris du séquençage à haut débit pour la recherche d'agents infectieux, offrirait ainsi l'opportunité de découvrir de nouveaux variants, voire de nouveaux agents infectieux (par exemple parmi les virus). En ce sens des investigations récentes ont permis par exemple la détection de plusieurs virus dans le guano de chauves-souris (Li et al., 2010; Wang et al., 2015a), et à partir de diptères hématophages grâce à des techniques de séquençage à haut débit (Nayduch et al., 2014).

Au Gabon, l'anthropisation croissante des grottes, dans le cadre d'activités touristiques et minières, pourrait favoriser des transferts d'agents infectieux vers les hommes. Pour la grande majorité des grottes anthropisées peu d'informations sont disponibles au sujet de risque zoonotique. Ainsi, la nécessité d'une part d'investiguer ces grottes, et d'autre part d'en explorer de nouvelles sur des territoires non encore prospectés, est dès lors plus qu'une évidence. Le but étant d'étudier l'entomofaune hématophage qui y vit et de détecter les agents infectieux associés présentant un potentiel zoonotique avant que ces derniers n'émergent chez l'homme.

### **3.4. Objectifs spécifiques**

Au regard des conditions environnementales particulières régnant dans les grottes, étudier les aspects biologiques tels que le cycle de vie, le cycle gonotrophique des insectes hématophages ainsi leur impact sur leur activité vectorielle constituerait une



importante avancée. Au Gabon, répondre aux problématiques liées à l'implication de la faune entomologique cavernicole dans les cycles naturels d'agents infectieux, ainsi que la mise en place d'éventuelles politiques et stratégies de lutte, nécessitent avant tout la connaissance préliminaire des espèces qui façonnent les communautés de diptères hématophages présentes dans les grottes. Cela implique également une meilleure connaissance des paramètres écologiques qui les caractérisent (diversité, dynamique spatio-temporelle, etc.), et des facteurs influençant ces paramètres. Ainsi, dans le but de donner des réponses à ces questions, nous avons initié notre travail dans six grottes réparties sur l'extrémité Est du Gabon. Il s'agit des grottes du Faucon, de Zadié, de Siyou, d'Itsoulou, de Kessipoughou et de Djibilong. **Ce travail a pour objectif principal de réaliser la caractérisation de l'entomofaune hématophage cavernicole de ces grottes, et d'étudier leur implication dans la transmission d'agents infectieux.**

Les objectifs spécifiques de ce travail sont 1) de réaliser des inventaires taxonomiques des insectes hématophages (Diptères : Culicidae, Phlebotominae, Ceratopogonidae, Nycteribiidae et Streblidae) colonisant ces cavités ; 2) d'analyser les communautés présentes dans chaque grotte ainsi que leur évolution temporelle ; 3) d'étudier les facteurs influençant ces communautés ; et 4) d'évaluer leur implication dans la transmission d'agents infectieux à l'aide des criblages moléculaires.



## Article 1

# Diversity and role in pathogen transmission of cave-dwelling hematophagous insects in the Afrotropical region

Running title : Arthropod vectors inside African caves

Judicaël Obame-Nkoghe<sup>1,2\*</sup>, Eric-Maurice Leroy<sup>1,2</sup> and Christophe Paupy<sup>1,2\*</sup>

Authors' affiliations:

1. Laboratoire MIVEGEC, UMR 224-5290 CNRS-IRD-UM1-UM2, IRD  
Montpellier, France
2. Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF),  
Franceville, Gabon

**Email addresses:**

JON: [judicael.obame@live.fr](mailto:judicael.obame@live.fr)

EML: [eric.leroy@ird.fr](mailto:eric.leroy@ird.fr)

CP: [christophe.paupy@ird.fr](mailto:christophe.paupy@ird.fr)

**\*Correspondence should be addressed to:** [judicael.obame@live.fr](mailto:judicael.obame@live.fr);

[christophe.paupy@ird.fr](mailto:christophe.paupy@ird.fr)

## **Abstract**

The progressive anthropization of caves for food resources or economic purposes increases human exposure to pathogens that naturally infect cave-dwelling animals. The presence of wild or domestic animals in the immediate surroundings of caves also may contribute to increasing the risk of emergence of such pathogens. Some zoonotic pathogens are transmitted through direct contact, but many others require arthropod vectors, such as blood-sucking insects. In Africa, hematophagous insects often play a key role in the epidemiology of many pathogens; however, their ecology in cave habitats remains poorly known. During the last decades, several investigations carried out in Afrotropical caves suggested the medical and veterinary importance particularly of insect taxa of the Diptera order. Therefore, the role of some of these insects as vectors of pathogens that infect cave-dwelling vertebrates has been studied. The present review summarizes these findings, brings insights into the diversity of cave-dwelling hematophagous Diptera and their involvement in pathogen transmission, and finally discusses new challenges and future research directions.

**Keywords:** Diptera, Zoonotic pathogens, Emergence, Bats, Caves, Africa

## Introduction

Caves have been used by earlier human ancestors, and then also by modern humans during the Paleolithic age to face climate hazards or for various shamanic cults. Previous investigations have highlighted the importance of caves for human life, culture and survival.<sup>1</sup> Currently, caves are becoming more and more anthropized, mainly for resource gathering by the nearby human populations or for economic purposes, such as ecotourism or mining. Therefore, the associated health risks, particularly those related to potential zoonotic pathogens that circulate among cave-dwelling vertebrates, need to be addressed. Contacts between animal reservoirs, such as bats living inside caves, and recipient hosts, such as humans and wild or domestic animals entering or living close to caves, may favor pathogen spillover to new hosts. In specific environmental conditions, these pathogens could easily cross species barriers and cause the emergence of new zoonotic diseases.

Among such pathogens, the most threatening for humans and domestic animals are viruses that, due to their diversity, are responsible for several diseases such as hemorrhagic (for

example, Filoviridae), respiratory (for example, coronaviruses), or encephalitic (for example, Henipaviruses) syndromes; bacteria causing bartonellosis (*Bartonella* spp.); and fungi, such as those causing histoplasmosis (*Histoplasma* spp.).<sup>2-4</sup> It is currently unknown whether blood parasites housed by cave-dwelling animal reservoirs can develop in humans, but they remain a potential zoonotic risk, as known for viruses. The recent discovery in humans of the monkey parasite *Plasmodium knowlesi* stands out as an example of the potential transfers of animal parasites to humans.<sup>5</sup>

While some zoonotic pathogens can be transferred through direct contact with the animal reservoir, others require blood-feeding arthropods. In caves and in the surrounding areas, humans and animals are almost inevitably exposed to hematophagous arthropods, especially insects. Although hematophagous insects play a key role in the epidemiology of zoonotic pathogens, very little is known about their ecology and distribution in cave ecosystems. Nevertheless, previous investigations have highlighted the great diversity of some insect groups, especially mosquitoes, sand flies, biting midges, bugs and other ectoparasites, in caves worldwide.<sup>6</sup>

In the Afrotropical region, most of the knowledge on cave-dwelling arthropod communities stems from studies carried out in West, Central and East Africa. Although very basic and mainly restricted to insects, these studies are still the reference for hematophagous dipterans, such as mosquitoes (Culicidae), biting midges (Ceratopogonidae), sand flies (Phlebotominae) and bat flies (Nycteribiidae and Streblidae). Members of the Diptera order have been particularly studied because of their importance in human and animal health, but other insect groups, such as bugs and fleas, have also been occasionally detected in African caves.<sup>7</sup> The present review summarizes the knowledge gained during forty years of investigations on the diversity of hematophagous dipterans living in Afrotropical caves and their involvement in pathogen transmission. It also discusses new challenges and future research directions in this field.

Relevant publications were identified by searching the NCBI PubMed and ISI Web of Knowledge databases and the database of the Office of the Assistant Secretary of Defence for Energy, Installations, and Environment (Armed Forces Pest Management Board (<http://www.afpmb.org/content/liter>

ature-retrieval-system) using key word combinations that included 'Diptera', 'Hematophagous', 'Cave-dwelling', 'Afrotropical', 'Ethiopian Region', 'Culicidae' 'Phlebotominae', 'Ceratopogonidae', 'Nycteribiidae', 'Streblidae', 'Caves', 'Cave-dwelling bats', 'Cave-dwelling vectors' and 'Haemosporidia'. Articles in French language were also included because they are particularly numerous on this topic in this part of the world. French articles were retrieved using the Horizon database, hosted by the Institut de Recherche pour le Développement ([www.horizon.ird.fr](http://www.horizon.ird.fr)) and the same key word combinations translated in French. Most of the cited literature is available online, but some of the articles can be made available upon request.

## **1. Caves are suitable breeding places for insects**

### **1.1 The cave physical and micro-climatic features**

As in other parts of the world, Afrotropical caves are characterized by stable levels of temperature/relative humidity and the absence of light.<sup>8</sup> Temperature usually ranges between 22 and 28 °C and relative humidity between 95% and 100%;<sup>9</sup> however, both are modulated by air flows that generate micro-climatic variations according to

the cave architecture and especially the size and shape of the internal chambers.<sup>10</sup> Differences in the rock physical nature and in the seepage or stream water features result in a great variety of caves that are mainly classified in caves formed in non-soluble or in soluble rock.<sup>11</sup> Caves formed in non-soluble rock are generally of volcanic origin, whereas soluble rock caves are usually found in karst landscapes (that is, areas rich in limestone and characterized by sinks, ravines and underground streams)<sup>11</sup> or more rarely in areas with lateritic rocks (that is, rocks rich in iron and aluminum), as observed in Gabon.<sup>12</sup>

## **1.2. Caves provide “board and lodging”**

### **1.2.1. Availability and characteristics of breeding places**

In caves, preimaginal development takes place in different breeding sites, from water pools to damp substrata, according to the dipteran group. Mosquitoes breed in residual water contained in rock pools or in shallow pools along the edge of underground rivers.<sup>13</sup> Larvae of biting midges develop in muddy substrata with a semi-liquid to slightly damp powdery texture.<sup>14</sup> Sand flies need generally dryer breeding sites and, depending

on the species, immature stages can develop deep in the soil or at the surface.<sup>15</sup> Although the different breeding sites have specific features, all contain organic matter to support preimaginal development. As the absence of light excludes the development of photosynthetic organisms, the endogenous sources of organic matter are mainly of bacterial and animal origin (decomposing products and bat droppings). Exogenous organic matter can be brought inside the cave through water runoff.

On the other hand, bat flies (Nycteribiidae and Streblidae), like all members of the superfamily Hippoboscoidea, reproduce via viviparous puparity. Thus, immature stages, from eggs to L3 larvae, develop in the uterine cavity until larviposition and progression from L3 larvae to pupae. Pupae that are not motile are found on rock walls or vaults close to their bat hosts until adult life.<sup>16</sup>

### **1.2.2. Blood source availability**

Like for the immature stages, adults of hematophagous dipterans have developed physiological and behavioral adaptations to the specific environmental conditions inside caves

(that is, temperature and relative humidity) and to the vertebrate hosts used as blood sources. Among mammals, bats and rodents are the main vertebrates found in Afrotropical caves.<sup>17</sup> Bats form very large colonies and live in high promiscuity, thus providing an unlimited blood source. More than 300 species from 70 genera have been reported in the Afrotropical region and at least 95 species from 34 genera, including Yangochiroptera and Yinpterochiroptera (for example, *Miniopterus* sp., *Rousettus* sp., *Hipposideros* sp., *Coleura* sp., *Rhinolophus* sp., *Pipistrellus* sp., *Nycteris* sp.), roost in caves.<sup>18</sup> All these bat species can potentially serve as blood sources for cave-dwelling dipterans, although only some species have been clearly identified as such.<sup>19,20</sup> The African porcupine (*Atherurus africanus* Gray) and rodents of the genus *Praomys* are the main taxa bitten by hemato-phagous cave-dwelling dipterans in African caves.<sup>17</sup>

### **1.3. Ecological classification and spatial occupancy of Diptera inside caves**

The current classification of the cave fauna is based on the ecological criteria proposed by earlier

speleologists in which species are grouped in three categories in relation with the degree of penetration in subterranean areas: troglonexic, troglophilic and troglobitic. Troglonexic dipterans are accidental, occasional or regular visitors that penetrate in caves for physiological reasons, associated with seasonal climatic variations (refuge during the dry season) or with resource gathering, but that do not complete their entire life cycle inside the cave.<sup>21</sup> Troglophilic species visit and usually breed inside caves, but can be found also in epigeous areas at all stages.<sup>21</sup> Troglobitic dipterans are exclusively confined in subterranean areas for their entire life cycle and their presence in epigeous area is exceptional and most often fatal.<sup>21</sup>

In caves, dipterans colonize all spaces, including those inaccessible to humans. Adults of flying Nematocera (for example, mosquitoes, sand flies or biting midges) rest on walls, vaults or crevices in rock walls and more rarely on soil or at the bottom of rocks. Sand flies prefer places with low air flow and are frequently observed inside secondary chambers, away from high air streams.<sup>22</sup> Blood-engorged female dipterans are regularly observed close to bats or near rodent holes, whereas males and unfed

teneral females occupy the area close to the breeding site or cave walls.<sup>22</sup> Conversely, adult bat flies live mostly on the body of bats.<sup>23</sup>

## **2. What is known about the diversity of blood-sucking Diptera in Afrotropical caves?**

Cave-dwelling Diptera remain poorly known worldwide and the very few studies dedicated to cave-dwelling hematophagous species only reported a limited number of taxa among mosquitoes, sand flies,<sup>24</sup> biting midges<sup>25</sup> and bat flies.<sup>26</sup> Most of the species of medical/ veterinary interest were found in Afrotropical caves.<sup>6</sup>

### **2.1. Mosquitoes (Culicidae)**

Among the almost thousand mosquito species of the Afrotropical region, only twelve have been described as cavernicolous. Because of their role in bat malaria transmission, species of the *Anopheles* (An.) genus have been more studied in some African countries, including the Democratic Republic of Congo (DRC), the Republic of Congo and occasionally Cameroon, Central African Republic (CAR), Gabon, Guinea and Madagascar (Table 1).

Besides the *Anopheles* genus, only *Uranotaenia* (Ur.) *cavernicola*

Mattingly in DRC, *Ur. fusca* Theobald and *Mansonia uniformis* Theobald in Madagascar were detected in caves (Table 1).

### **2.2. Sand flies (Phlebotominae)**

The current knowledge on cave-dwelling sand flies in Africa is mainly based on studies carried out in Central, West and East Africa that reported the presence of several genera: *Spelaeophlebotomus* (Sl.), *Phlebotomus* (Ph.), *Sergentomyia* (Se.) and *Spelaeomyia* (Sa.). *Sl. gigas* Parrot and Schwetz (Table 1) was one of the first species discovered in caves. Although for a long time this species was thought to be endemic in DRC, it was subsequently found throughout Central and West Africa.<sup>27</sup> Further investigations reported other cave-dwelling sand fly species of the genera *Phlebotomus* (Ph.), *Sergentomyia* (Se.) and *Spelaeomyia* (Sa.) in the continent (Table 1).

### **2.3. Biting midges (Ceratopogonidae)**



Among biting midges, hematophagous species mainly belong to the genus *Culicoides* and, to a lesser extent, to the genera *Forcipomyia* and *Leptoconops*. These species have been largely documented in epigeous areas in South, East and West Africa, while they remain poorly studied in Central Africa.<sup>28</sup> Although few studies have been undertaken in some caves in Central Africa, biting midges still remain under-documented in cave environments across the continent. Nevertheless, more than twenty species have been detected in caves, including fifteen new descriptions, but only three are hematophagous (Table 1), and their biology still remains unknown.

#### 2.4. Bat flies (Nycteribiidae and Streblidae)

About 40 species and sub-species of Nycteribiidae and 32 species and sub-species of Streblidae are known in Africa.<sup>29,30</sup> Most of them parasitize epigeous bats in the Congo Basin (Central Africa) and southern Africa. Bat flies have been recorded also in Nigeria (West Africa), Cameroon (Central Africa), Kenya, Sudan, Tanzania and Uganda (East Africa).<sup>29</sup> Specific studies on bat flies that parasitize cave-dwelling bats remain rare across the African continent and

only six species have been described so far (Table 1). Two Nycteribiidae species (*Penicilidia fulvida* Bigot and *Nycteribia schmidlii scotti* Falcoz) parasitize mainly cave-dwelling bats of the genera *Miniopterus* (Republic of Congo, Gabon) and *Rhinolophus* (Republic of Congo).<sup>20,31</sup> *Eucampsipoda africana* Theodor infests the cave-dwelling *Rousettus aegyptiacus* Geoffroy in South Africa and Gabon.<sup>20,32</sup> Three Streblidae species (*Raymondia simplex* Jobling, *R. seminuda* Jobling and *Raymondioides leleupi* Jobling) have been found on *Miniopterus* and *Rhinolophus* bats that live in caves of the Republic of Congo.<sup>31</sup> In Gabon, *Raymondia huberi* Frauenfeld and *Brachytarsina allaudi* Falcoz infest the bat species *Hipposideros caffer* Sundevall and *Hipposideros gigas* Wagner, respectively.<sup>20</sup>

### 3. What is known about the vector role of blood-sucking Diptera in Afrotropical caves?

In tropical caves, several thousand bats often aggregate in very large roosts, thus favouring the circulation of pathogens, including many viruses, such as Lyssaviruses, Filoviruses, Coronaviruses, Paramyxoviruses or



Flaviviruses.<sup>33</sup> The presence of bat-biting dipterans in cave ecosystems increases the risk of arthropod-borne pathogen transmission because these insects are known vectors of blood parasites (for example, mosquitoes, sand flies and biting midges), viruses (for example, mosquitoes, sand flies and biting midges), bacteria (for example, mosquitoes and sand flies) and filarial parasites (for example, mosquitoes and biting midges)

### 3.1. Vector-borne parasites

#### 3.1.1. Haemosporidia

Several arthropod-borne haemosporidian parasites have been identified in African cave-dwelling hosts, including rodents and bats. Among Plasmodidae, *Plasmodium atheruri* Van Den Berghe, Lambrecht and Zaghi, which infects African porcupines, has been found in the salivary glands of *An. smithii* complex members in caves of Cameroon<sup>34</sup> and Ghana.<sup>35</sup> *Anopheles vanthieli* Laarman and *An. caroni* Adam were also identified as vectors of this parasite in Republic of Congo.<sup>18</sup> However *An. hamoni* Adam is a suspected vector of *P. atheruri* and other blood parasites of the genera *Hepatocystis* and *Nycteria*.<sup>18</sup> Members of the *An. smithii* complex are vectors of

*Plasmodium voltaicum* Van der Kaay, a parasite that infects the bats *Lyssonycotis smithii* Thomas in Ghana and *Lyssonycotis angolensis* Bocage in the Republic of Congo.<sup>36,37</sup> Although their role has never been formally demonstrated, cave-dwelling *Anopheles* are also suspected to transmit *Plasmodium roussetti* Van Riel that infects the fruit bat *Rousettus aegyptiacus*.<sup>17</sup>

In caves, sand flies are mostly known for their role in the epidemiology of saurian Haemosporidia.<sup>38</sup> In Africa, about twenty *Plasmodium* species have been detected in reptiles.<sup>39</sup> Therefore the presence of various reptiles in caves could suggest a possible role of sand flies in saurian Haemosporidia circulation in these environments.

In the Afrotropical region, biting midges are considered the main vectors of bat *Hepatocystis* parasites in epigeous environments.<sup>40</sup> However, their role in the transmission of *Hepatocystis* and other parasites, such as *Nycteria*, inside caves is only suspected, but not formally demonstrated.<sup>17</sup>

After *Anopheles* mosquitoes, bat flies are the most documented vectors of bat malaria parasites in caves. *Polychromophilus* parasites mainly infect bats of several genera, including

Miniopterus, Rhinolophus, Myotis, Pipistrellus, Hipposideros, Antrozous and Glosophaga.<sup>17</sup> Most of these bats are found in Afrotropical caves, especially the species *Miniopterus minor minor* Peters, *Rhinolophus sylvestris* group Aellen and *Hipposideros caffer* that are infected by *Polychromophilus* almost permanently.<sup>41</sup> Recent investigations in Gabon caves revealed that the bat fly species *P. fulvida* and *Nycteribia schmidlii scotti* are heavily infected by *Polychromophilus melanipherus*. Moreover, the finding that both bat fly species parasitize *Miniopterus inflatus* Thomas, a natural host of this parasite,<sup>20,42</sup> suggests that these bat fly species might transmit this parasite. Infections by *P. melanipherus* have also been observed in *Eucampsipoda africana*, a Nycteribiidae species that infests cave-dwelling bats.<sup>20</sup> To date, flies from the Streblidae family have never been incriminated in the transmission of haemosporidian parasites. Nevertheless, their vector role should be reinvestigated because *P. melanipherus* was molecularly detected in the streblid species *Brachytarsina allaudi* and *Raymondia huberi*.<sup>20</sup> More-over, infecting stages of a bat malaria parasite (*Vetufebrus ovatus* Poinar) were previously observed in a streblid specimen.<sup>43</sup>

### 3.1.2. Filarial, leishmanial and trypanosomatid parasites

Bats are important vertebrate hosts of filarial nematodes. Thirty-four genera of nematodes have been described<sup>44</sup> and *Litomosa* and *Litomosoides* (Onchocercidae) are the best known.<sup>45</sup> In Africa, bats, including cave-dwelling taxa,<sup>46</sup> are infected mainly by parasites of the *Litomosa* genus, but few cases of infections by *Litomosoides* have also been reported.<sup>45</sup> Infections by *Litomosa* spp. have been detected in several bat families.<sup>47</sup> The vectors remain unknown, although mites (Macronyssidae)<sup>48</sup> are suspected, as well as other dipterans, including Culicidae, Phlebotominae and Ceratopogonidae.

Sand flies are well-recognized vectors of *Leishmania* parasites in the tropics. Recent studies in caves of the Neotropical region (also called South American region) revealed that bats are infected by *Leishmania* sp.<sup>49</sup> In Africa, cave-dwelling bats are important natural hosts of *Leishmania* parasites;<sup>50</sup> however, the role of sand flies as vectors remains to be confirmed, despite their frequent co-occurrence with bats in caves.

Trypanosomatid parasites circulate among cave-dwelling reservoirs, including bats and rodents, in the Afrotropical region.<sup>51</sup> The transmission modalities remain under-investigated. In the Neotropical region, sand flies are known vectors of trypanosomatid parasites.<sup>52</sup> Conversely, in the Afrotropical region only the genus *Spelaeomyia emilii* Parrot and Wanson is suspected to be involved in the transmission of *Trypanosoma vespertilionis* Battaglia that infects cave-dwelling bats in the Republic of Congo.<sup>51</sup> Besides sand flies, mosquitoes, particularly within the genus *Culex*, are suspected to be vectors of avian,<sup>53</sup> amphibian<sup>54</sup> and reptilian<sup>55</sup> trypanosomatid parasites.

### 3.2. Viruses

Currently, it is not clear how hematophagous arthropods are involved in the circulation of viruses in cave ecosystems due to the limited number of studies on this question. Cave-dwelling vertebrates, including bats, are recognized hosts of a large diversity of zoonotic viruses, such as Paramyxoviruses, Lyssaviruses, Coronaviruses, Filo-viruses, Hantaviruses and particularly arboviruses (for instance, the Flaviviridae, Bunyaviridae and Reoviridae families).<sup>33</sup> Some of them

cause diseases in humans or in domestic animals.<sup>56,57</sup> Most of the arboviruses or potential arboviruses found in African bats have been reported or isolated from the bat genera *Nycteris*, *Miniopterus* or *Hipposideros*.<sup>33</sup> Considering the major role of dipterans, such as mosquitoes, sand flies, bat flies or even biting midges, in the transmission of bat arboviruses,<sup>58</sup> it would be of great interest to thoroughly investigate the epidemiology of arboviruses in cave ecosystems, by carrying out arbovirus screening in cave-dwelling bats and hematophagous dipterans.

### 3.3. Bacteria

Little is known about the role of hematophagous insects in the epidemiology of bacteria that infect wild mammals living in African caves. Among the known arthropod-borne bacteria, *Bartonella* spp. is one of the most widely transmitted among vertebrates, including bats.<sup>59</sup> In cave environments, bats are the main hosts of bacteria and bacteria are mainly transmitted by bat ectoparasites, such as ticks (Arachnida) and bat flies.<sup>60</sup> In Africa, recent studies described *Bartonella* spp. infections in the cave-dwelling bats *Eidolon helvum* Kerr and *E. dupreanum* Schlegel and

Pollen, and showed the potential role of the Nycteribiidae *Cyclopodia greefi greefi* Karsch and *Cyclopodia dubia* Westwood in their transmission.<sup>61,62</sup> Although the *Bartonella* species were not identified, previous phylogenetic investigations highlighted the strong similarity between the *Bartonella* spp. found in bat flies and in bats, suggesting that bat flies might be the involved vectors.<sup>63</sup>

Like bat flies, sand flies also are *Bartonella* spp. vectors.<sup>64</sup> Although *Bartonella* spp. circulate in Afrotropical cave ecosystems,<sup>59</sup> sand fly role in their transmission has not been investigated yet.

*Borrelia* bacteria infect different bat species worldwide,<sup>60</sup> but little is known about African bats. Ticks are the primary vectors of *Borrelia* bacteria<sup>65</sup> and several mosquito genera, such as *Anopheles*, *Culex* and *Aedes*, are suspected to ensure their transmission.<sup>66</sup>

#### **4. Challenges and future research directions**

The circulation of a wide range of pathogens hosted by vertebrate reservoirs in cave environments constitutes a potential major hazard for the health of humans and domestic animals because of the cave progressive anthropization. Some previous studies have shown that

some species of sand flies (for example, *Sl. gigas*) and mosquitoes (for example, *An. hamoni* and *An. caroni*) are opportunistic and can feed on bats, rodents, and occasionally humans.<sup>10,67</sup> Some caves that host large communities of hematophagous dipterans are located in villages, towns, and even in farming concessions.<sup>19</sup> This can increase the contact between cavernicolous hematophagous dipterans and humans, thus favouring the accidental transmission of pathogens to humans or livestock. Such contacts and transfers could occur when people or domestic animals enter inside caves, but also via troglonec dipteran species that could bring pathogens from inside the cave to the cave surroundings, which may include areas inhabited by human populations. Depending on the pathogen and on the host susceptibility, a new pathogen could emerge in humans and cause local outbreaks, if it can find a suitable vector to ensure its epidemic transmission among humans. Due to their ability to transmit some pathogens, cave-dwelling hematophagous dipterans are of important concern for researchers and health authorities. Among the Diptera-related factors that contribute to the zoonotic hazard of cave environments, the most

important are: (i) the ability to support natural enzootic and intra-specific pathogen cycles that involve a natural primary reservoir. This could increase the risk of opportunistic or accidental inter-specific transmission to humans or domestic animals; and (ii) the ability of cave-dwelling hematophagous dipterans, particularly trogloneic insects, to bite humans or domestic animals, even accidentally. However, contacts between cave fauna and humans are not yet widespread and generally, are still restricted to the surrounding populations and only occasionally to far-away victims.

To date, little is known about Diptera ecology and their vector role in Afrotropical caves. Indeed, basic data were collected several decades ago by few passionate researchers who made substantial efforts to overcome the inaccessibility and hostile environmental conditions of African caves. This pioneering research was not further pursued, although many questions remain unanswered about the transmission cycles involving arthropod vectors. Recent technical advances (that is, molecular biology and high-throughput sequencing tools for vector taxonomy and pathogen screening) could certainly help filling in these gaps. The renewed interest on cave-dwelling Diptera and

associated pathogens, as attested by recent studies in Gabon, provided new insights into the diversity of cave-dwelling insects of medical importance.<sup>20</sup> The discovery of several pathogens in cave-dwelling reservoirs using advanced molecular tools<sup>68</sup> should help assessing the risk of transfer to humans or domestic animals that live in the vicinity of caves. Indeed pathogen surveillance of wild and domestic animals in cave-associated areas would improve our knowledge on the transmission risk as well as on arthropod-borne pathogens and their associated vectors. Studies on parasite ecology, such as their life cycle and the gonotrophic cycle of vectors, could bring crucial information on how these bioecological features influence pathogen epidemiology in cave-associated areas. Extending research to caves of new areas and to other arthropod groups of medical and veterinary importance, such as bugs, fleas and ticks, will provide integrated data on the diversity, spatial distribution and role in pathogen epidemiology of cave-dwelling hematophagous arthropods.

### **Acknowledgments**

We deeply thank Dr. Richard Oslisly from the *Agence Nationale des Parcs Nationaux (ANPN)*, Libreville,

Gabon and Nil Rahola from the *Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF)*, Franceville, Gabon for their help in data acquisition.

### Competing interest

We have no competing interests.

### Authors' contribution

JON, EML and CP designed the research; JON and CP wrote the paper. All authors approved the final manuscript.

### Funding Statements

This research was co-funded by the *Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF)*, the Global Viral Forecasting Initiative-METABIOTA and the *Programme Pilote Régional Forêts Tropicales Humides (PPR FTH)* housed in the *Institut de Recherche pour le Développement (IRD)*.

### References

- 1 Abadia OM, Gonzalez Morales MR. Paleolithic art: a cultural history. *J Archaeol Res* 2013; 21: 269–306.
- 2 Nieves-Rivera AM, Santos-Flores CJ, Dugan FM, Miller TE. Guanophilic fungi in three caves of southwestern Puerto Rico. *Int J Speleol* 2009; 38: 71–82.
- 3 Plowright RK, Eby P, Hudson PJ et al. Ecological dynamics of emerging bat virus spillover. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 2015; 282: 20142124.
- 4 Reeves WK, Loftis AD, Gore JA, Dasch GA. Molecular evidence for novel Bartonella species in Trichobius major (Diptera: Streblidae) and Cimex adjunctus (Hemiptera: Cimicidae) from two southeastern bat caves, USA. *J Vector Ecol* 2005; 30: 339–341.

- 5 Singh B, Daneshvar C. Human infections and detection of Plasmodium knowlesi. *Clin Microbiol Rev* 2013; 26: 165–184.
- 6 Matile L. Les Diptères cavernicoles. *Ann speleol* 1970; 25: 179–222.
- 7 Fain A. Notes sur les Punaises parasites de Chiroptères de la République du Zaïre avec description de deux espèces et d'une sous-espèce nouvelles. *Rev Zool Bot Afr* 1972; 85: 187–202.
- 8 Sondag F, Van Ruymbeke M, Soubiès F et al. Monitoring present day conditions in tropical caves using an environmental data acquisition system (EDAS). *J Hydrol* 2003; 273: 103–118.
- 9 Gamble DW, Dogwiler JT, Mylroie J. Field assessment of the microclimatology of tropical flank margin caves. *Clim Res* 2000; 16: 37–50.
- 10 Vattier-Bernard G. Contribution à l'étude systématique et biologique des phlébotomes cavernicoles en Afrique intertropicale (2ème partie). *Cah ORSTOM Ser Ent Med Parasitol* 1970b; 8: 231–288.
- 11 Lignier V. Éléments de Karstologie et Géologie pour Spéléo - Stage perfectionnement du CDS 69. 2008; Available at: <http://cds69.free.fr/wp-content/uploads/Rapport-karstologie-Vincent-Lignier.pdf>. French.
- 12 Adam JP. Rapport sur une mission au Gabon pour l'étude préliminaire de la faune de quelques grottes de la région de Makokou (18 au 31 janvier 1966), 1966; Available at <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:10541>. French.
- 13 Van Someren ECC, Mutinga MJ. Interesting mosquito records from Kenya. *Mosq Syst Newslett* 1971; 3: 211.
- 14 Vattier-Bernard G, Adam JP. Les Ceratopogonidae des grottes de la République du Congo. *Ann Speleol* 1966; 21: 711–773.
- 15 Vattier-Bernard G. Etudes morphologique et biologique des phlébotomes cavernicoles du Congo-Brazzaville. *Ann Speleol* 1971; 26: 149–171.
- 16 Dittmar K, Dick CW, Patterson BD, Whiting MF, Gruwell ME. Pupal deposition and ecology of bat flies (Diptera: Streblidae): Trichobius sp. (caecus group) in a Mexican cave habitat. *J Parasitol* 2009; 95: 308–314.
- 17 Adam JP. Les hémospories parasites d'animaux cavernicoles, Fonds IRD fdi:28690, 1974. Available at <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:28690>. French.
- 18 African Chiroptera Report (ACR). AfricanBats, Pretoria 2014. Available at: [www.africanbats.org](http://www.africanbats.org) (accessed on 4 August 2014).
- 19 Adam JP. [Transmission of haemosporidia by Anopheles mosquitoes in the caves of Congo (Brazzaville)]. *Bull World Health Organ* 1965; 32: 598–602.
- 20 Obame-Nkoghe J, Rahola N, Bourgarel M et al. Bat flies (Diptera: Nycteribiidae and Streblidae) infesting cave-dwelling bats in Gabon: diversity, dynamics and potential role in Polychromophilus melanipherus transmission. *Parasit Vectors* 2016; 9: 333.
- 21 Vandel A. Biospéléologie: La Biologie des Animaux Cavernicoles. Gauthier-Valliers (ed), Paris, 1964, p 619.



- 22 Vattier-Bernard G. Notes sur la biologie de deux espèces de phlébotomes cavernicoles africains. *Bull Soc Ecol* 1971; 2: 293–301.
- 23 Dick CW, Patterson BD. Batflies - Obligate ectoparasites of bats. In: Morand S, Krasnov BR, Poulin R (eds). *Micromammals and Macroparasites From Evolutionary Ecology to Management*. Springer-Verlag: Tokyo, Japan, 2006, 179–196.
- 24 Alves VR, Freitas RA, Santos FL, Barrett TV. Diversity of sandflies (Psychodidae: Phlebotominae) captured in sandstone caves from Central Amazonia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011; 106: 353–359.
- 25 Wirth WW. The biting midges of the Batu caves, Malaysia (Diptera: Ceratopogoniade). *Pacific Insects* 1980; 21: 304–307.
- 26 Maa TC. Records and descriptions of Nycteribiidae and Streblidae (Diptera). *Pacific Insects* 1962; 4: 417–436.
- 27 Vattier-Bernard G, Adam JP. Connaissances actuelles sur la répartition géographique des phlébotomes cavernicoles africains; Considérations sur l'habitat et la biologie. *Ann Speleol* 1969; 24: 143–161.
- 28 Itoua A, Comet M, Vattier-Bernard G, Trouillet J. Les Ceratopogonidae (Diptera, Ceratopogonidae) d'Afrique Centrale. *Cah ORSTOM Ser Entomol Med Parasitol* 1987; 25: 127–134.
- 29 Theodor O. An Illustrated Catalogue of the Rothschild Collection of Nycteribiidae (Diptera) in the British Museum (National History) with Keys and Short Descriptions for the Identification of Subfamilies, Genera, Species and Subspecies. Trustees of the British Museum (Natural History): London, 1967.
- 30 Theodor O. A revision of the Streblidae (Diptera) of the Ethiopian Region. *Trans R Entomol Soc Lond* 1968; 120: 313–373.
- 31 Adam JP, Landau I. Developmental stages of *Polychromophilus* sp., a parasite of insectivorous bats from the Congo-Brazzaville, in the nycteribiid fly *Penicillidia fulvida* Bigot 1889. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1973b; 67: 5–6.
- 32 Jansen van Vuren P, Wiley M, Palacios G et al. Isolation of a Novel Fusogenic Orthoreovirus from *Eucampsipoda africana* Bat Flies in South Africa. *Viruses* 2016; 8: 65–89.
- 33 Maganga GD, Bourgarel M, Vallo P et al. Bat distribution size or shape as determinant of viral richness in african bats. *PLoS One* 2014; 9: e100172.
- 34 Mouchet J, Gariou J, Rivola E. [Observations on the biology of *Anopheles smithii* var. *rageai* Mattingly and Adam 1954, vector of a mammalian *Plasmodium* in the outskirts of Yaoundé (southern Cameroon)]. *Bull Soc Pathol Exot* 1957; 50: 157–164.
- 35 Brady J. The occurrence of *Anopheles smithii* var. *rageai* Mattingly and Adam in Ghana, with a note on its possible implication as a vector of non-human malaria. *Ann Trop Med Parasitol* 1965; 59: 99–105.
- 36 Adam JP. Transission d'hémosporides chez les animaux cavernicoles. International Congress of Parasitology. Vienne: Facta Publication 1974; 85–86.
- 37 Adam JP, Landau I. *Plasmodium voltaicum* au Congo-Brazzaville. *J Parasitol* 1970; 56: 391–393.
- 38 Ayala SC, Lee D. Saurian malaria. Development of sporozoites in 2 species of phlebotomine sandflies. *Science* 1970; 167: 891–898.
- 39 Mutinga MJ, Dipeolu OO. Saurian malaria in Kenya. Epidemiologic features of malarial infections in lizard populations of the Pokot district. *Int J Parasitol* 1990; 20: 149–153.
- 40 Landau I. Diversité des mécanismes assurant la pérennité de l'infection chez les sporozoaires coccidiomorphes. *Mem Mus Natl Hist Nat Paris A Zool* 1973; vol. 77: 62 pp.
- 41 Adam JP, Landau I. *Polychromophilus* sp. Hemoproteidea parasite of Microchiroptera in Congo (Brazzaville). *Cah Orstom Ser Ent Med Parasitol* 1973; 11: 147–152.
- 42 Duval L, Mejean C, Maganga GD et al. The chiropteran haemosporidian *Polychromo-philus melanipherus*: A worldwide species complex restricted to the family *Miniopteridae*. *Infect Genet Evol* 2012; 12: 1558–1566.
- 43 Poinar GO Jr. *Vetufebus ovatus* n. gen., n. sp. (Haemospororida: Plasmodiidae) vectored by a streblid bat fly (Diptera: Streblidae) in Dominican amber. *Parasit Vectors* 2011; 4: 229–233.
- 44 Morand S, Bouamer S, Hugot J-P. Nematodes. In: Morand S, Krasnov BR, Poulin R (eds). *Micromammals Macroparasites: From Evolutionary to Ecology Managment*. Springer-Verlag: Tokyo, 2006, 63–79.
- 45 Ramasindrazana B, Dellagi K, Lagadec E et al. Diversity, Host Specialization, and Geographic Structure of Filial Nematodes Infecting Malagasy Bats. *PLoS One* 2016; 11: 1–18.
- 46 Martin C, Bain O, Jouvenet N et al. First report of *Litmosa* spp. (Nematoda: Filarioidea) from Malagasy bats; review of the genus and relationships between species. *Parasite* 2006; 13: 3–10.
- 47 Raharimanga V, Arie F, Cardiff SG et al. Hemoparasites of bats in Madagascar. *Arch Inst Past Mad* 2003; 69: 70–76.
- 48 Guerrero R, Bain O, Attout T, Martin C. The infective larva of *Litmosoides yutajensis* Guerrero et al., 2003 (Nematoda: Onchocercidae), a Wolbachia-free filaria from bat. *Parasite* 2006; 13: 127–130.
- 49 Ogawa GM, Pereira Junior AM, Resadore F et al. Sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) from caves in the state of Rondonia, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2016; 25: 61–68.
- 50 Kassahun A, Sadlova J, Benda P et al. Natural infection of bats with *Leishmania* in Ethiopia. *Acta Trop* 2015; 150: 166–170.
- 51 Adam JP. Hématozoaires des chiroptères en Afrique Centrale. *Cah Orstom Ser Ent Med Parasitol* 1973; 6075: 2–7.
- 52 Zeledon R, Rosabal R. *Trypanosoma Leonidasdeanei* sp. nov. in insectivorous bats of Costa Rica. *Ann Trop Med Parasitol* 1969; 63: 221–228.
- 53 Votypka J, Szabova J, Radrova J, Zidkova L, Svobodova M. *Trypanosoma culicavium* sp. nov., an avian trypanosome transmitted by *Culex* mosquitoes. *Int J Syst Evolut Microbiol* 2012; 62: 745–754.
- 54 Bartlett-Healy K, Crans W, Gaugler R. Vertebrate hosts and phylogenetic relationships of amphibian trypanosomes from a potential invertebrate vector, *Culex territans* Walker (Diptera: Culicidae). *J Parasitol* 2009; 95: 381–387.
- 55 Telford SR. Haemoparasites of reptiles. In: Hoff GL, Frye FL, Jacobson ER (eds). *Diseases of Amphibians and Reptiles*. Spriger: USA, 1984; 385–517.
- 56 Chua KB, Cramer G, Hyatt A et al. A previously unknown reovirus of bat origin is associated with an acute respiratory disease in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 11424–11429.
- 57 Faburay B, Wilson WC, Gaudreaux NN et al. A Recombinant Rift Valley Fever Virus Glycoprotein Subunit Vaccine Confers Full Protection against Rift Valley Fever Challenge in Sheep. *Sci Rep* 2016; 6: e277719.
- 58 Melaun C, Werblow A, Busch MW, Liston A, Klimpel S. Bats as potential reservoir hosts for vector-borne diseases. In: Klimpel S, Mehlhorn H (eds). *Bats (Chiroptera) as Vectors of Diseases and Parasites*. Berlin: Springer, 2014; 25–61.
- 59 Kosoy M, Bai Y, Lynch T et al. *Bartonella* spp. in bats, Kenya. *Emerg Infect Dis* 2010; 16: 1875–1881.
- 60 Mühlendorfer K. Bats and bacterial pathogens: a review. *Zoonoses Public Health* 2013; 60: 93–103.
- 61 Billeter SA, Hayman DTS, Peel AJ et al. *Bartonella* species in bat flies (Diptera: Nycteribiidae) from western Africa. *Parasitology* 2012; 139: 324–329.

- 62 Brook CE, Bai Y, Dobson AP et al. Bartonella spp. in Fruit Bats and Blood-Feeding Ectoparasites in Madagascar. PLoS Neglect Trop Dis 2015; 9: e0003532.
- 63 Morse SF, Olival KJ, Kosoy M et al. Global distribution and genetic diversity of Bartonella in bat flies (Hippoboscoidea, Streblidae, Nycteribiidae). Infect Genet Evol 2012; 12: 1717–1723.
- 64 Billeter SA, Levy MG, Chomel BB, Breitschwerdt EB. Vector transmission of Bartonella species with emphasis on the potential for tick transmission. Med Vet Entomol 2008; 22: 1–15.
- 65 Burgdorfer W. Discovery of the Lyme disease spirochete and its relation to tick vectors. Yale J Biol Med 1984; 57: 515–520.
- 66 Magnarelli LA, Freier JE, Anderson JF. Experimental infection of mosquitos with Borrelia burgdorferi, the ethiologic agent of Lyme disease. J Infect Dis 1987; 156: 694–695.
- 67 Adam JP. Les Culicidae cavernicoles du Congo et de l'Afrique intertropicale. Ann Speleol 1965; 20: 409–423.
- 68 Li L, Victoria JG, Wang C et al. Bat guano virome: predominance of dietary viruses from insects and plants plus novel mammalian viruses. J Virol 2010; 84: 6955–6965.
- 69 Wanson M, Lebiec B. Anopheles (Myzomyia) vanhoofi sp. n. Rev Zool Bot Africaines 1945; 39: 199–229.
- 70 Leleup N, Lips M. Un anophèle nouveau du Katanga. Anopheles rodhaini. Rev Zool Bot Africaines 1950; 43: 303–308.
- 71 Leleup N. Un anophèle nouveau du Kibali-Itouri. Anopheles faini n. sp. Rev Zool Bot Africaines 1952; 46: 151–158.
- 72 Mattingly PF, Adam JP. A new species of cave-dwelling anopheline from the french Cameroon. Ann Trop Med Parasitol 1954; 48: 55–57.
- 73 Abonnenc E. Sur un anophèle cavernicole de la Guinée: Anopheles cavernicolus n. sp. (Diptera-Culicidae). Bull Mem Ec Med Pharm Dakar 1954; 2: 288–290.
- 74 Laarman JJ. A new species of Anopheles from a rainforest in eastern Belgian Congo. Trop and geogr medecine 1959; 2: 147–156.
- 75 Adam JP. Anopheles caroni n. sp. un anophèle (Diptera Culicidae) cavernicole de la République du Congo. Bull Soc Path Exot 1961; 54: 714–717.
- 76 Adam JP. Un anophèle cavernicole nouveau de la République du Congo (Brazzaville): Anopheles hamoni n. sp. (Diptera-Culicidae). Bull Soc Path Exot 1962; 55: 153–163.
- 77 Remillet M. Aperçu de la faune souterraine à Madagascar. In: Academiei Republicii Socialiste Romania (ed). Livre du Cinquantenaire de l'Institut de Spéléologie "Emile Racovitza". Colloque National de Spéléologie. Bucharest, 1973, pp 135–160.
- 78 Mattingly PF. Notes on Ethiopian Uranotaenia (Diptera-Culicidae) with description of a new species. Proc R Ent Soc Lond B 1954; 23: 166–171.
- 79 Lawyer PG, Mebrahtu YB, Ngumbi PM et al. Phlebotomus Guggisbergi (Diptera, Psychodidae), a vector of Leishmania tropica in Kenya. Am J Trop Med Hyg 1991; 44: 290–298.
- 80 Vattier-Bernard G, Adam JP. Capture de Ceratopogonidae (Diptera) Dans les Grottes de la République Gabonaise. Fonds IRD fdi:29022, 1965. Available at <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:29022>. French.



**Table 1: Known cave-dwelling hematophagous Diptera in the Afrotropical region**

Species	Site	Country	Vector role	References
<b>Mosquitoes</b>				
<i>An. vanhoofi</i>	Mbanza-Ngungu	DRC	Suspected vector of Plasmodium spp.	18,69
<i>An. rodhaini</i>	Likasi	DRC	Suspected vector of Plasmodium spp.	18,70
<i>An. faini</i>	Yolaha firi	DRC	Suspected vector of <i>P. roussetti</i>	18,71
<i>An. smithii</i>	Oliga	Cameroon	Vector of <i>P. atheruri</i> and <i>P. voltaicum</i>	18,36,37,72
<i>An. cavernicolus</i>	Dalaba region	Guinea	Unknown	73
<i>An. vanthieli</i>	Irangi	DRC	Vector of <i>P. atheruri</i>	18,74
<i>An. caroni</i>	Matouridi	Congo-Brazzaville	Vector of <i>P. atheruri</i>	18,75
<i>An. hamoni</i>	Meya-Nzouari	Congo-Brazzaville	Suspected vector of Plasmodium spp. Hepatocystis spp., Nycteria spp.	18,76
<i>An. pauliani</i>	Aven Anjohy	Madagascar	Unknown	77
<i>Ur. cavernicola</i>	Yolaha firi	Congo-Brazzaville	Unknown	78
<i>Ur. fusca</i>	Bemaraaha	Madagascar	Unknown	77
<i>Ma. uniformis</i>	Bemaraaha	Madagascar	Unknown	77
<b>Sand flies</b>				
<i>Sl. gigas</i>	Matadi	DRC	Unknown	27
<i>Sa. emilii</i>	Loudima	Congo-Brazzaville	Suspected vector of <i>Trypanosoma vespertilionis</i>	27,51
<i>Sa. darlingi</i>	Jabel Tozi	Sudan	Unknown	27
	Sikasso	Mali	Unknown	27
<i>Sa. moucheti</i>	Koumba	Cameroon	Unknown	27
	Bébé	CAR	Unknown	27
<i>Se. mirabilis</i>	Mbanza-Ngungu	DRC	Vector of <i>Leishmania</i> spp., <i>Trypanosoma</i> spp.	10,27
<i>Se. balmicola</i>	Akok-Bekue	Cameroon	Unknown	27
<i>Se. africana</i>	Muruku	Kenya	Unknown	79
<i>Se. bedfordi</i>	Muruku	Kenya	Unknown	79
<i>Ph. somaliensis</i>	Shama-Aleh	Somalia	Unknown	27
<b>Biting midges</b>				
<i>C. brosetti</i>	Faucon	Gabon	Unknown	80
<i>C. grenieri</i>	Meya-Nzouari	Congo-Brazzaville	Unknown	80
<i>C. rageaui</i>	Meya-Nzouari	Congo-Brazzaville	Unknown	80
<b>Bat flies</b>				
<i>P. fulvida</i>	Undetermined	Congo-Brazzaville	Suspected vector of <i>P. melanipherus</i>	20,51
	Kessipoughou, Djibilong, Faucon	Gabon		20
<i>N. schmidlii</i>	Undetermined	Congo-Brazzaville	Suspected vector of <i>P. melanipherus</i>	20,51
	Kessipoughou, Djibilong, Faucon	Gabon		20
<i>E. africana</i>	Mahoume	South Africa	Unknown	32
	Kessipoughou, Zadie	Gabon	Unknown	20
<i>R. simplex</i>	Undetermined	Congo-Brazzaville	Unknown	51
<i>R. seminuda</i>	Undetermined	Congo-Brazzaville	Unknown	51
<i>R. huberi</i>	Kessipoughou, Djibilong	Gabon	Unknown	20
<i>B. allaudi</i>	Kessipoughou	Gabon	Unknown	20
<i>R. leleupi</i>	Undetermined	Congo-Brazzaville	Unknown	

In these studies, flying dipterans (mosquitoes, sand flies and biting midges) were collected manually on cave walls or using light traps. Bat flies were collected manually on captured bats.





## **PARTIE 2**

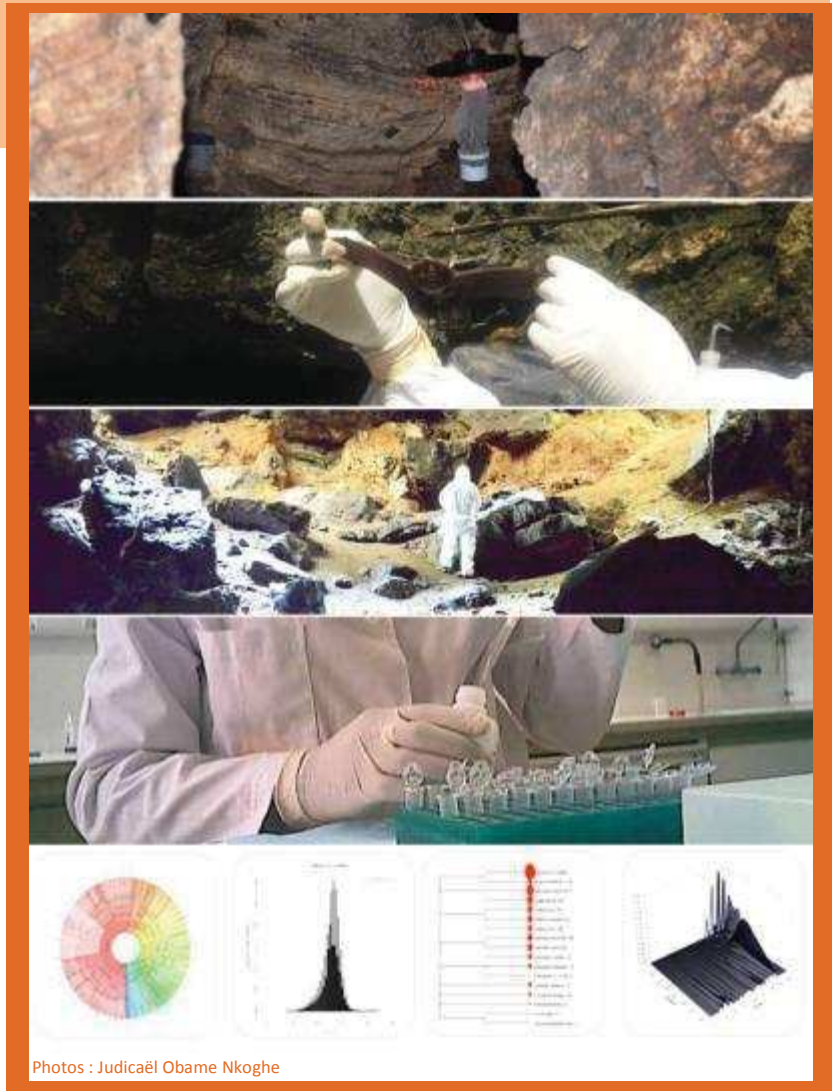
---

# **MÉMOIRE EXPÉRIMENTAL**

## Chapitre 4

# Outils méthodologiques

*Ce chapitre présente les procédures expérimentales mises en œuvre durant ce travail de thèse. Ainsi après une présentation des sites d'étude, les méthodes et les stratégies d'échantillonnage des diptères seront exposées ainsi que les approches utilisées pour l'analyse des données et le criblage d'agents infectieux.*



#### 4.1. Présentation des sites d'étude

Nous avons mené notre étude dans six grottes réparties à travers le pays (Figure 21). Il s'agit des grottes du Faucon, de Zadié (dans la forêt de Bélinga, Nord-Est) ; de Kessipoughou, de Siyou et d'Itsoulou (région de Lastourville, Centre-Ouest) ; et la grotte de Djibilong (à une vingtaine de kilomètres au Nord de la ville de Franceville, sud-est).

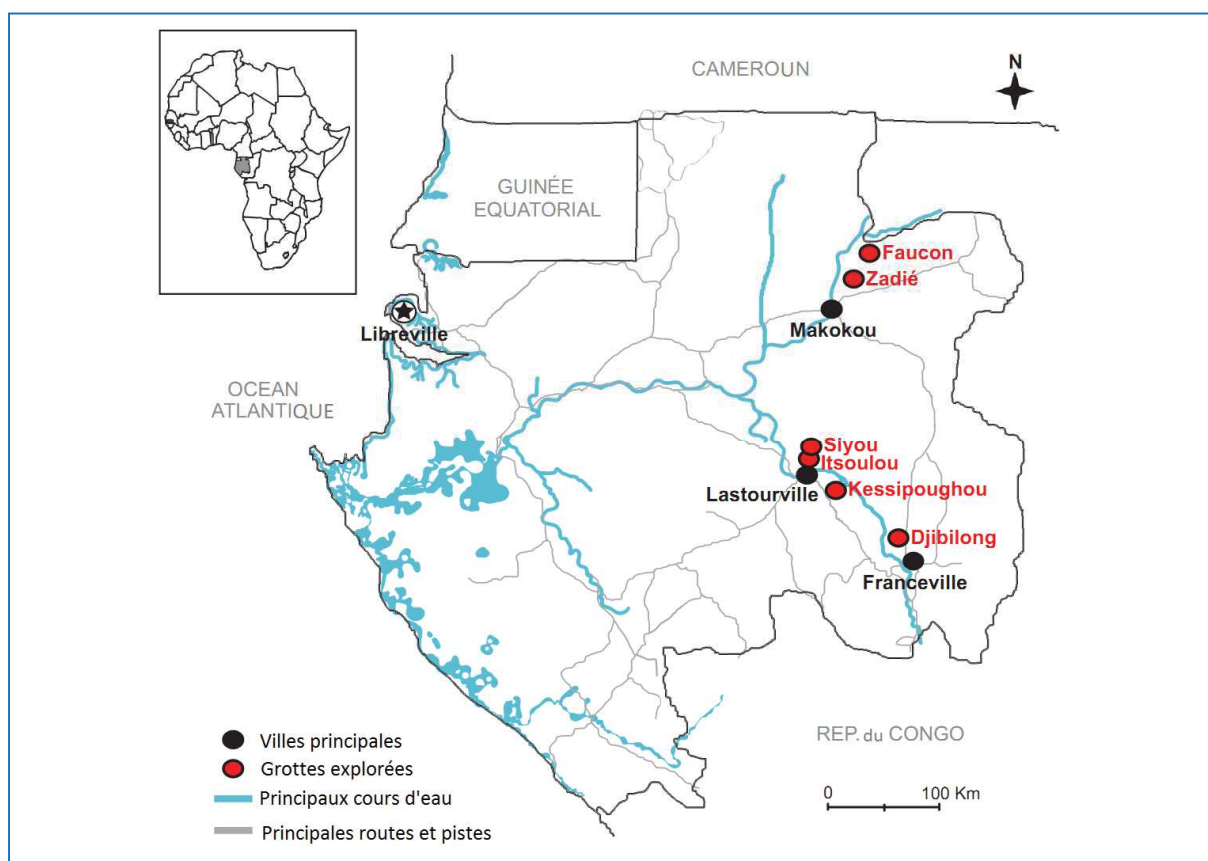


Figure 21 : Localisation des grottes investiguées

##### 4.1.1. Les grottes de la forêt de Bélinga

###### 4.1.1.1. La grotte du Faucon

La grotte du Faucon (N1.07287 E13.20739), creusée dans des roches ferrugineuses, est située dans la forêt de Bélinga au Nord de la ville de Makokou. Pour y accéder, il faut compter 3h30mn en voiture entre la ville de Makokou et le camp minier de Bélinga, puis 1h30mn de marche à pieds en forêt entre le camp et la grotte. Cette

dernière s'ouvre sur une entrée mesurant environ 5 m de haut, au point le plus élevé, et une dizaine de mètres de large (Figure 22). Cette entrée donne accès à une salle principale mesurant une soixantaine de mètres tant de long que de large. Cette salle présente une cheminée permettant l'entrée de quelques rayons de lumière provenant de l'extérieur. La grotte est très humide, avec un taux d'hygrométrie avoisinant les 100%. Des galeries situées à des hauteurs variables au fond et de part et d'autre de la salle principale, mènent à des chambres secondaires, dont les plus difficiles d'accès n'ont pas été visitées. Le sol est recouvert d'une épaisse couche (plusieurs mètres), parfois mouvante, de guano humide. Une mare peu profonde, dont l'écoulement est lent, est alimentée par des eaux d'infiltration ruisselant le long des parois rocheuses. Elle se déverse à l'extérieur par l'intermédiaire d'un ruisseau longeant le côté droit de la grotte. Le fond de la marre est très boueux et riche en guano de chauve-souris. Par ailleurs la condensation importante à l'intérieur de la grotte tend à maintenir humide l'ensemble des parois. Cependant elles présentent de nombreuses anfractuosités où la roche est plus sèche.



**Figure 22** : Grotte du Faucon (vue de l'entrée)

La grotte abrite de très nombreuses chauves-souris qui occupent la quasi-totalité de la voute et des parois. La communauté de chauves-souris a été estimée à 75 000 individus (Bourgarel, 2009). De nombreuses traces d'athérures (épines et traces de griffes) sont observables au sol. La faune guanobie est composée de nombreuses espèces d'arthropodes (adultes et stades pré-imaginaux) donnant l'impression d'amas « grouillants ».

#### **4.1.1.2. La grotte de Zadié**

La grotte de Zadié (N0.98595 E13.19745), est creusée dans des roches ferrugineuses. Comme la grotte du Faucon, elle est accessible depuis le camp minier de Belinga et nécessite 1h30mn de marche en forêt. L'entrée principale de la grotte, située à 40 m d'altitude, mesure environ 5 m de haut, au point le plus élevé, et 8 m de large (Figure 23). Une entrée secondaire, plus petite (1 m de large), est située à droite de l'entrée principale. Malgré sa large ouverture, la grotte est peu éclairée, en raison de la présence de grands arbres occultant la lumière du jour. On trouve deux salles. La salle principale, mesurant une trentaine de mètres de long et de large, possède un plafond haut de plus de 10 m par endroit. Deux galeries de faible profondeur sont observables de part et d'autre de la salle principale, dont l'une située à droite, mène à une salle inférieure, à peine plus étroite que la première. Cette grotte est relativement sèche, comparée à la grotte du Faucon. On peut observer des gouttelettes d'eau issues de la condensation et qui peuvent donner lieu à de rares collections d'eau au sol. Il n'y a pas de ruisseau et le sol est recouvert de guano terreux et pulvérulent.

La grotte de Zadié abrite elle aussi une colonie de chauves-souris, qui se répartissent sur l'ensemble de la voute et sur quelques parois rocheuses sur quelques mètres à l'extérieur de l'entrée principale. Les chauves-souris, concentrées dans les



salles principales supérieure et inférieure, sont difficilement observables dans les galeries latérales. Elles y nichent peu. En plus des chauves-souris, des traces sur le sol témoignent de la présence d'athérures. Divers invertébrés tapissent le sol et se développent en masse sur le guano sec.



**Figure 23** : Grotte de Zadié (vue de l'entrée)

#### **4.1.2. La grotte de Kessipoughou**

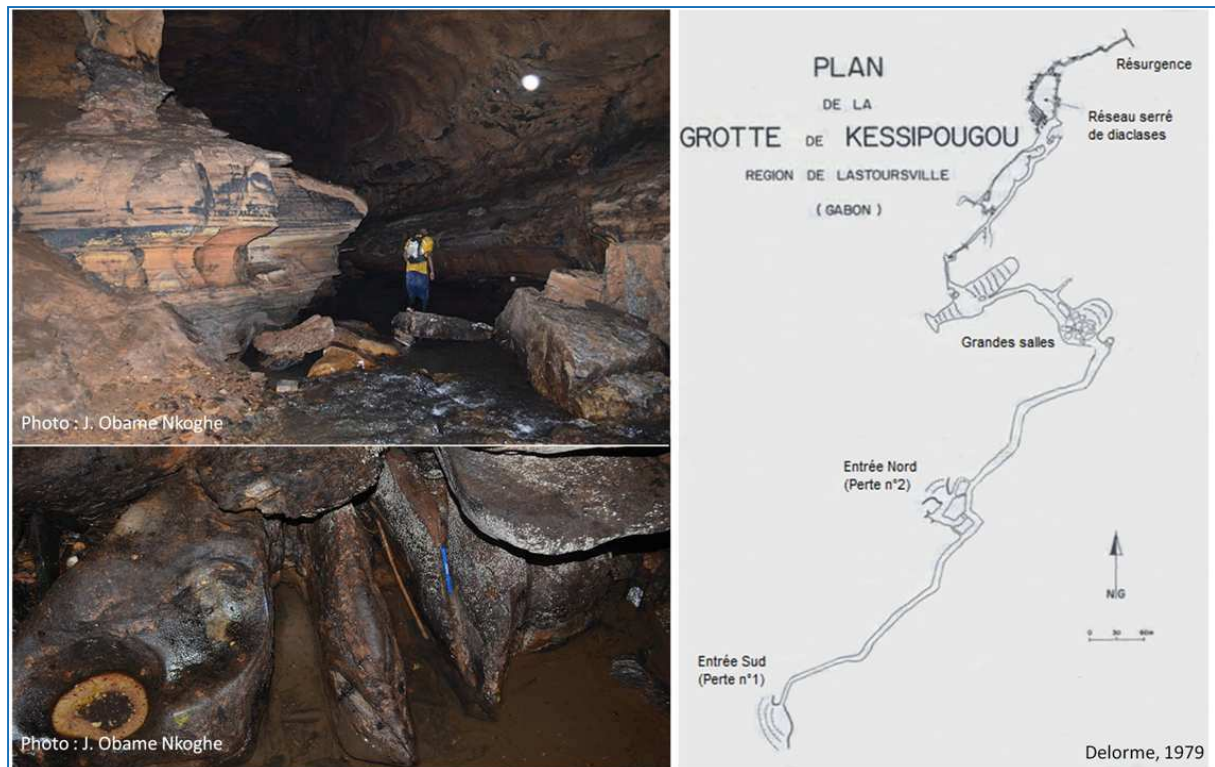
La grotte de Kessipoughou (S0.869533 E12.7895), appelée aussi *Ngoungourouma* (signifiant « la plus immense » en langue *Nzébi* du Gabon) est creusée dans les roches dolomitiques du bassin sédimentaire du Francevillien. Elle est localisée en forêt à 6 km du village de Kessipoughou (Centre-Ouest), lui-même situé à 21 km de la ville de Lastoursville en empruntant l'axe routier reliant Lastoursville et la ville de Moanda. Pour rejoindre la grotte à partir du village, il faut parcourir 4 km en voiture sur une ancienne piste forestière et poursuivre à pieds pendant 2 km.

La grotte de Kessipoughou, figurant parmi les plus grands réseaux karstiques du Gabon, présente deux entrées principales, l'une au Nord, l'autre au Sud. L'entrée Nord, située au pied d'une falaise, est masquée par l'écoulement d'une puissante cascade, se transformant en une véritable chute d'eau en saison pluvieuse. Cette entrée donne accès à des boyaux qui débouchent dans la grande salle principale, mesurant une vingtaine de mètres de haut. Cette salle correspond à un long tunnel longé par le lit d'une rivière souterraine sur 1200 m depuis l'entrée Sud. Par endroit ce tunnel peut atteindre des largeurs de 10 à 15 m. On retrouve plusieurs boyaux de part et d'autre du lit de la rivière. Le taux d'humidité y est supérieur à 95% (Figure 24).

Sur les rives du lit central, on peut observer des creux formés dans la roche contenant de l'eau riche en matière organique. Les rives sont couvertes de grandes quantités de guano maintenu humide par de l'eau s'écoulant d'anfractuosités pariétales et qui alimente le cours d'eau central. La communauté de chauves-souris est très importante, pouvant atteindre plusieurs dizaine de milliers (observation personnelle). Les chauves-souris occupent l'ensemble des galeries, ainsi que les profonds boyaux dont certains sont difficilement accessibles par l'homme. Comme dans les autres grottes des traces d'athérures sont observées.

#### **4.1.3. Les grottes de Siyou et Itsoulou**

Les grottes de Siyou (S00.80889 E12.76334) et d'Itsoulou (S00.80639 E12.77389) se situent toutes deux dans la forêt jouxtant la ville de Lastoursville. Elle sont géographiquement proches et sont creusées les dolomitiques du bassin sédimentaire du Francevillien. L'entrée de la forêt donnant accès à ces grottes se situent à une dizaine de kilomètre du centre ville de Lastoursville.



**Figure 24** : Grotte de Kessipougou (plan de la grotte d'après (Delorme, 1979))

L'accès à l'intérieur de la grotte de Siyou (Figure 25) s'effectue par une entrée accidentée au pied d'une falaise. Elle est creusée en forme de tunnel d'un peu plus de 40 m de long et dont la largeur est variable (jusqu'à plus de 10 m). Elle est traversée par un ruissellement d'eau provenant de la l'extrémité opposée s'ouvrant sur une cascade. Sur le sol, tout au long des eaux de ruissellement, plusieurs collections d'eau se distribuent au sol et dans des creux de rocher contenant des crottes de chauve-souris frugivores. Cette grotte est traversée par un courant d'air et pénétrée de façon importante par la lumière dans une de ces extrémités.

La grotte d'Itsoulou est formée de plusieurs galeries organisées en un vaste réseau réparti sur plusieurs niveaux (nous en avons visité deux). Cette grotte possède plusieurs entrées, et est traversée, par endroits par un ruissellement souterrain alimenté par une cascade principale. Dans cette grotte, plusieurs collections d'eau sont observables le long des galeries irriguées, tandis que dans les galeries plus sèches,

le sol a une texture poudreuse humide. Les galeries proches de certaines entrées sont parcourues par un léger courant d'air, mais sont peu pénétrées par la lumière extérieure.



**Figure 25** : Grotte de Siyou (photo : Olivier Testa)

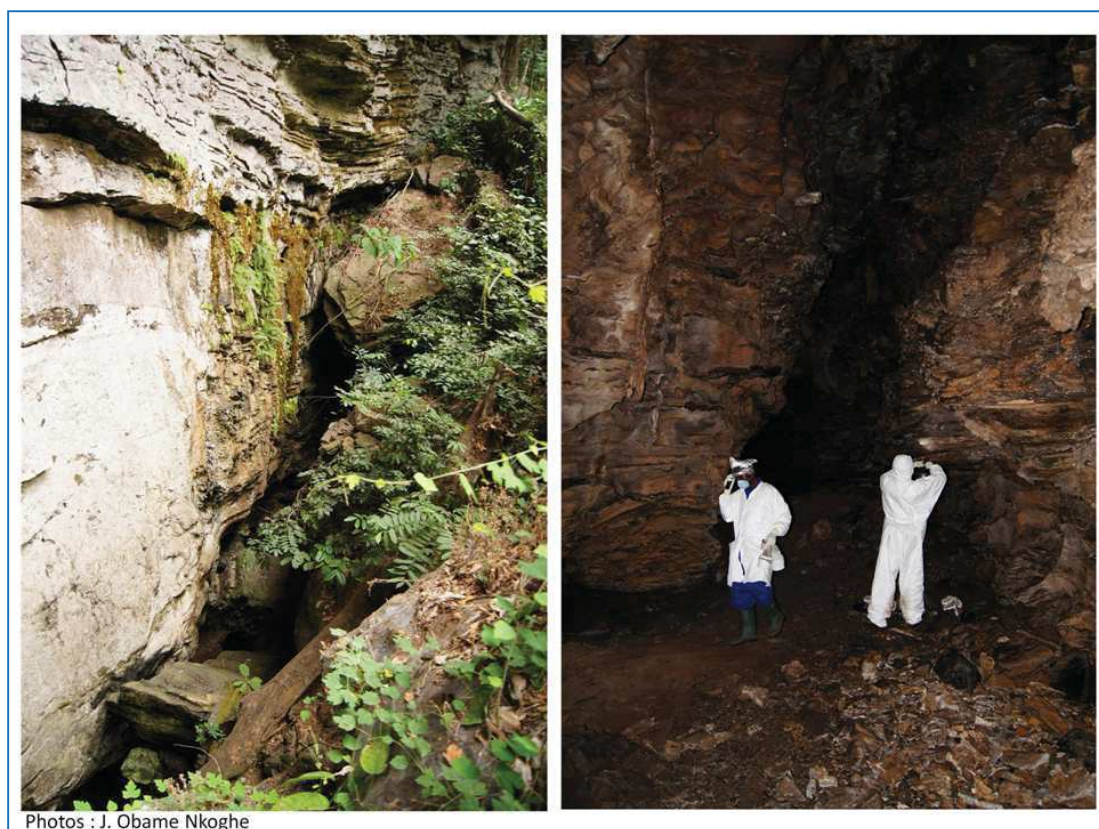
#### **4.1.4. La grotte de Djibilong**

La grotte de Djibilong (S0.362617 E13.462967), creusée dans le bassin sédimentaire du Francevillien, se situe à une cinquantaine de kilomètres au Nord de la ville de Franceville, dans la concession du ranch de LEKABI (Figure 26). Pour y accéder, il faut se rendre en voiture au ranch (40 km de Franceville), puis parcourir une dizaine de kilomètres à travers la savane. La grotte est située à cinq minutes à pieds, au cœur d'une colline surplombant un îlot forestier.

L'entrée mesure une dizaine de mètres de large, et pas plus de 2 m de haut. L'accès est en pente raide sur une quinzaine de mètres et nécessite l'emploi d'une corde. Cette large ouverture est obstruée par d'énormes éboulis rocheux. L'intérieur de la grotte est constitué d'une salle principale large d'une quarantaine de mètres au sol très pierreux, qui se prolonge de part et d'autre en deux salles secondaires. Une troisième salle plus étroite se situe à l'extrémité droite de la salle principale. La salle



secondaire gauche, haute de plus de 20 m, large de 5m et profonde sur un peu plus de 30 m, contient un petit lac peu profond (moins d'un mètre) d'une largeur maximale de 25 m. Le niveau d'eau du lac fluctue en fonction des saisons pluvieuses et sèches. Bien qu'aucun écoulement issu de l'extérieur ne soit visible, l'eau semble tout de même provenir d'infiltrations issues de la voute et des parois, comme en témoigne l'aspect très humide des parois à certains endroits. La salle secondaire de droite est de dimension similaire à la première, mais son sol est recouvert de guano terreux humide. La chambre plus étroite située à l'extrémité droite de la salle principale est profonde d'une dizaine de mètres et son sol est sableux et moins fourni en guano. De nombreuses anfractuosités sont visibles sur les parois de l'ensemble de la grotte, et les plafonds abritent des chauves-souris qui gîtent en forte promiscuité. La température à l'intérieur de la cavité oscille entre 24 et 25°C et l'humidité ambiante est élevée, toujours au dessus de 95%.



**Figure 26** : Grotte de Djibilong

## 4.2. Stratégie d'échantillonnage et identifications taxonomiques

### 4.2.1. Collecte des diptères libres

Les collectes de Culicidae, Phlebotominae, et Ceratopogonidae ont été réalisées à l'aide de pièges lumineux de type CDC (Figure 27) dans l'ensemble des grottes investiguées.

Nous avons collecté les diptères dans les grottes suivant un plan transversal (Faucon, Zadié, Siyou et Itsoulou) ou longitudinal (Kessipoughou et Djibilong) de collectes.



**Figure 27** : Capture des diptères libres au piège lumineux de type CDC

Nous avons utilisé un ensemble de quatre (Faucon, Zadié, Siyou et Itsoulou) à cinq (Kessipoughou et Djibilong) pièges dans chaque grottes. Nous les avons positionnés de manière à éviter tout effet de compétition entre eux. Au cours des captures longitudinales, les positions des pièges sont restées fixes dans le temps. Les pièges ont été activés pendant 1) 48 heures consécutives par mois dans les grottes du Faucon, Zadié (Janvier et Février 2011) et de Siyou (Août 2013) ; 2) 96 heures consécutives

par mois à Itsoulou (Août 2013) et à Kessipoughou et Djibilong (durant 11 mois entre Mai 2012 et Avril 2013). Pour l'ensemble de l'étude, nous avons déployé un total de 496 pièges, représentant 11 904 heures d'échantillonnage. Toutes les 24 heures, les nasses étaient relevées afin de procéder à l'identification, et au comptage des différents spécimens collectés. Pour ce faire, des laboratoires de terrain (Figure 28) ont été aménagés sur nos lieux de campements. Ils comprenaient tout le matériel nécessaire (loupes binoculaires, congélateur mobile, etc...) et une alimentation électrique grâce à groupe électrogène mobile. Le tri et la mise en lots des diptères ont été réalisés en respectant



**Figure 28** : Laboratoire de terrain

un maximum la chaîne du froid. Les diptères ont été sacrifiés en les plaçant à  $-20^{\circ}\text{C}$  durant une heure avant d'être triés sur des pains de glace pour préserver les spécimens de Culicidae, Phlebotominae et Ceratopogonidae. Les Culicidae ont été identifiés jusqu'à l'espèce sur le terrain à l'aide d'une clé d'identification que nous avons produite à partir de mises à jour de la clé d'identification des Culicidae de la Région Ethiopienne (Edwards, 1941). Les espèces ont été dénommées en accord avec



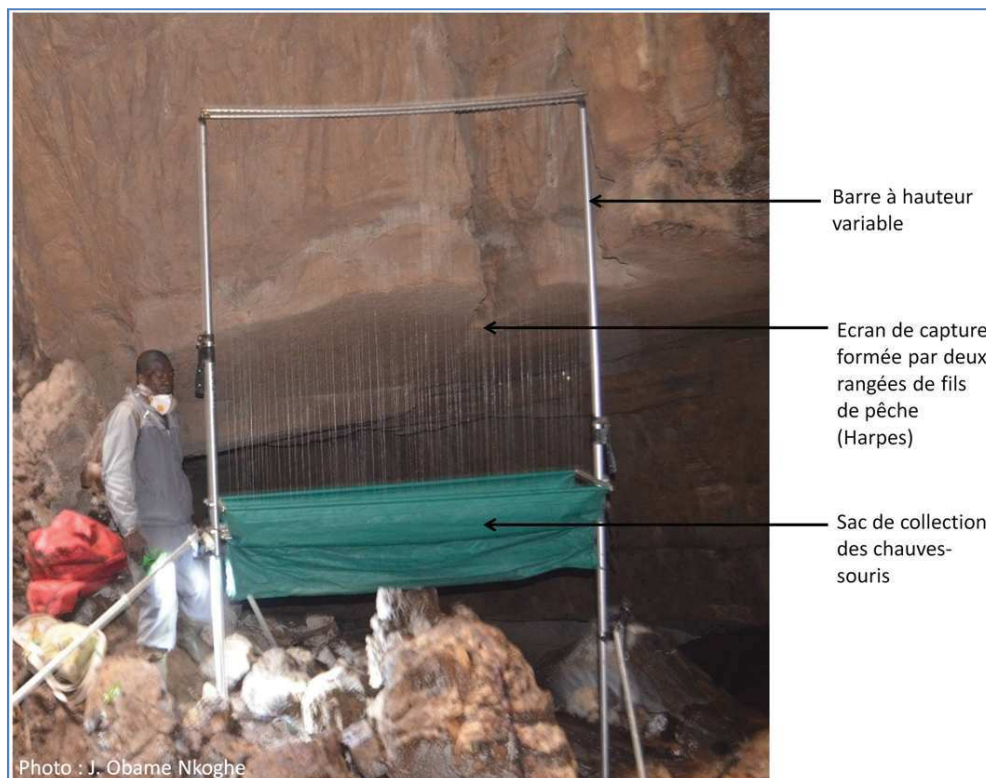
la liste des noms d'espèces de Culicidae valides disponible en ligne (<http://mosquito-taxonomic-inventory.info>). L'ensemble des diptères a ensuite été stocké en azote liquide et transporté au laboratoire pour la suite des analyses. Les Phlebotominae et les Ceratopogonidae, également préservés en lot en azote, ont été identifiés de retour au laboratoire à l'aide de mises à jour des clés d'identification des Phlebotominae (Abonnenc, 1972) et des Ceratopogonidae (Canute et al., 1971; Cornet, 1981; Glick, 1990) de la Région Éthiopienne. Ces identifications morphologiques ont été réalisées sur la base d'observations au microscope photonique des têtes, ailes, génitalia et spermathèques, montés entre lame et lamelle. Une partie de ces diptères a fait l'objet d'un montage temporaire (à des fins d'identification uniquement), tandis qu'une autre partie a fait l'objet d'un montage permanent afin d'alimenter les collections. La préparation temporaire a consisté à plonger les diptères dans une solution de Marc-André (Abonnenc, 1972) préchauffée à 60°C et à les monter entre lame et lamelle. Les carcasses des diptères ont été conservées à -80°C pour le criblage ultérieur d'agents infectieux. Pour la préparation du montage permanent, les diptères ont été montés suivant un protocole dédié à cet effet (Annexe 1). Tous les diptères ont été regroupés par tranches horaires de collecte en lots mono-spécifiques comprenant au plus 10 individus pour les Culicidae, 20 individus pour les Phlebotominae et les Ceratopogonidae.

Pour les grottes ayant fait l'objet d'un suivi longitudinal, nous avons collecté les données pluviométriques externes disponibles auprès du site du Département américain en charge du service météorologique national en collaboration avec le Centre Américain de Prédiction Météorologique (<http://www.cpc.ncep.noaa.gov/products/fews/africa>). Les données pluviométriques correspondent à des estimations mensuelles des précipitations accumulées sur le continent Africain. Les données des grottes dont nous avons fait le suivi ont été recueillies en utilisant les coordonnées GPS.



#### 4.2.-2. Collecte des diptères ectoparasites

Pour la réalisation de l'échantillonnage de Nycteribiidae et Streblidae nous avons procédé à des collectes de chauves-souris dans les grottes du Faucon, de Zadié, de Kessipoughou et de Djibilong. Ces dernières ont été collectées chaque mois durant 2 nuits consécutives (entre Février et Avril 2011) dans les grottes du Faucon et de Zadié, et durant 4 nuits consécutives au cours du suivi longitudinal décrit précédemment, dans les grottes de Kessipoughou et de Djibilong. Pour ce faire, nous avons utilisé un piège harpe (G7 Cave Catcher Harp Trap © , Bat Conservation and Management, Inc.) (Figure 29) déployé de 17h00 à 7h00. Chaque matin, les chauves-



**Figure 29** : Piège harpe dressé

Les fils de pêche tendus verticalement forment un écran permettant l'interception des chauves-souris en vol à la sortie de la cavité. Après avoir percuté les fils, ces dernières tombent dans le sac de collection (en vert).

souris contenues dans le sac de collection ont été transférées dans des sacs de contention en toile en attendant d'être identifiées. Une fois l'identification effectuée, les ailes et la fourrure de chaque spécimen de chauves-souris ont été inspectées pour détecter et collecter les ectoparasites à l'aide de fines pinces. Sur le terrain, les ectoparasites ont été regroupés en lots par individu de chauve-souris et immédiatement stockés en azote liquide, puis conditionnés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Après inspection, les chauves-souris ont été relâchées à l'entrée des grottes.

Au laboratoire, les ectoparasites ont été identifiés en chambre froide à  $+4^{\circ}\text{C}$  par observation, à l'aide d'une loupe binoculaire, de caractères morphologiques diagnostics décrits dans les clés d'identification de Theodor (Theodor, 1967, 1968).

### 4.3. Analyse des communautés, tests statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R (version 3.0.2) et de Microsoft Office Excel 2007.

La richesse spécifique ( $S$ ) a été définie comme le nombre d'espèces collectées, et pour chacune des grottes nous avons estimé sa représentativité en calculant l'indice de Chao (Chao, 1987), en utilisant la commande *estimateR* du package *Vegan*. Pour évaluer notre effort d'échantillonnage dans les grottes où nous avons effectué un suivi longitudinal (Kessipoughou et Djibilong), nous avons construit des courbes d'accumulation d'espèces, en utilisant la méthode de randomisation à hauteur de 1000 permutations à l'aide de *Vegan* (Oksanen et al., 2013). La densité apparente ( $DA$ ) des diptères est définie comme le nombre de spécimens collectés par piège et par jour de collecte. Pour chacune des grottes nous avons estimé un indice de dominance spécifique ( $d$ ) pour chaque espèce en fonction des familles et sous-famille de diptères grâce à l'équation de Berger-Parker (Magurran, 1988),  $d = Ni/N$ , où  $Ni$  correspond au nombre d'individus de la  $i^{\text{ème}}$  espèce récoltée, et  $N$  le nombre total des

individus collectés.  $d$  (traduisant l'abondance relative des espèces) varie de 0 à 1, et tend vers 1 quand la dominance d'une espèce est grande, et vers 0 quand celle-ci est faible. Nous avons également estimé la diversité des communautés de diptères, à l'aide d'indices numériques tels que la richesse spécifique et l'indice de diversité de Shannon ( $H$ ) (Shannon, 1949), que nous avons calculé à l'aide de la commande *diversity* du package *Vegan*.

Pour évaluer le degré de similarité entre grottes en termes de composition d'espèces (type et nombre d'espèces) et de densité des espèces (relatif au nombre d'individus par espèce), nous avons calculé l'indice de similarité de Morisita-Horn ( $C$ ) (Magurran, 2003) entre les grottes en utilisant la commande *vegdist*. Comme *vegdist* estime la dissimilarité ( $C'$ ), nous avons donc calculé la similarité par l'équation  $C = 1 - C'$ . L'indice  $C$  prend ses valeurs de 0 (aucune similarité) à 1 (maximum de similarité avec 100% d'identité entre deux sites).

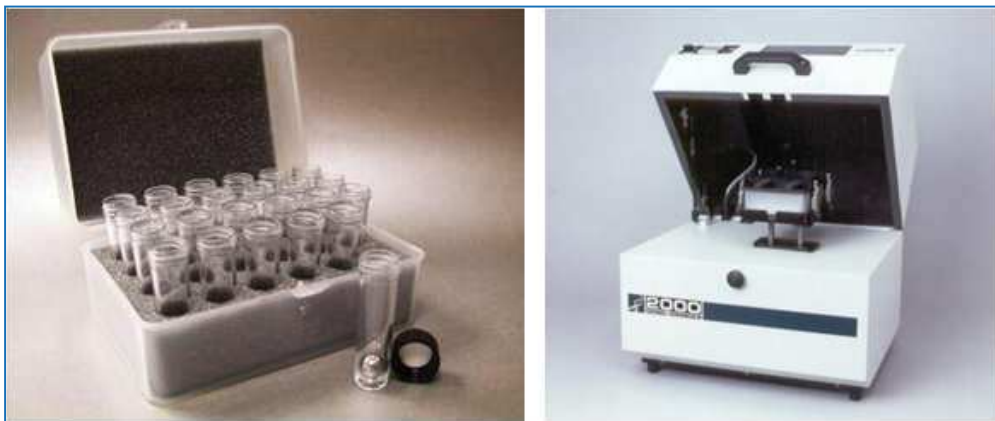
Nous avons exploré l'évolution temporelle ainsi que les facteurs influençant l'abondance des diptères collectés ( $A$ ), la richesse spécifique et l'indice de diversité de Shannon à Kessipoughou et Djibilong. La pluviométrie mensuelle a été choisie comme variable environnementale explicative pour étudier de la variation temporelle de ces paramètres. Les données pluviométriques mensuelles grâce à leurs coordonnées GPS à partir du site en ligne du Département Américain en charge de la météorologie et du climat (<http://www.cpc.ncep.noaa.gov/products/fews/africa>), sur lequel sont stockées les données climatiques de différentes régions du monde, y compris d'Afrique. Les relations entre ces paramètres ont été explorées grâce à un Modèle Linéaire Généralisé (GLM, *Generalized Linear Model*) réalisé indépendamment pour chaque groupe de diptères (famille/sous-famille) à l'aide du package *lme4* (Bates et al., 2015) en utilisant  $A$ ,  $S$  et  $H$  comme « variables réponses ». En raison de la colinéarité entre l'abondance de chauves-souris collectées et les données pluviométriques, nous avons estimé deux modèles séparés pour chaque groupe de

diptères en utilisant la pluviométrie d'une part et l'abondance de chauves-souris d'autre part comme « variables explicatives ».

Pour comparer le taux d'infestation moyen des chauves-souris par leurs ectoparasites et le nombre moyen d'ectoparasites par chauve-souris infectée en considérant tour à tour les grottes ensemble et séparément, nous avons effectué une analyse de variance (ANOVA, *Analysis of variance*). Pour évaluer le degré d'association entre les espèces d'ectoparasites et les chauves-souris, nous avons utilisé, à l'aide du package *lme4*, des Modèles Linéaires Généralisés Mixtes (GLMM, *Generalized Linear Mixed Models*), en estimant la fréquence de chauves-souris infestées (comme variable réponse) en fonction des espèces d'ectoparasites, des sites (grottes), et des mois de collecte (variables explicatives). Dans ces modèles, nous avons considéré l'interaction existant entre les ectoparasites et les chauves-souris comme étant un facteur fixe. Cependant nous avons considéré les sites et les mois de collectes comme des facteurs aléatoires. L'analyse de la significativité de l'interaction ectoparasites-chauves-souris, que nous avons estimé par le Critère d'Information Akaike (AIC, de l'anglais Akaike Information Criterion) (Akaike, 1974), nous a permis de sélectionner le modèle estimant le mieux la relation entre l'infestation des chauves-souris (fréquence de chauves souris infestées) et les variables explicatives sus-citées. Nous avons ainsi évalué les variations de l'AIC par des ajouts ou soustractions dans le modèle de paramètres à l'aide du package *MuMIn* (Tene Fossog et al., 2015). Le meilleur modèle est obtenu lorsque  $\Delta AIC_C = 0$ . Cependant, la variation a été considérée comme significative pour des valeurs de  $\Delta AIC_C < 2$ . Enfin, pour évaluer l'association entre 1) le niveau d'infestation des chauves-souris et la pluviométrie extérieure et 2) l'abondance des ectoparasites et la pluviométrie extérieure, nous avons construit deux modèles linéaires en prenant comme variables réponses, l'infestation des chauves-souris (premier modèle), et l'abondance des ectoparasites (second modèle) et la pluviométrie comme variable explicative.

#### 4.4. Criblage d'agents infectieux

Pour réaliser le criblage d'agents infectieux dans les arthropodes collectés dans les grottes, nous avons dans un premier temps procédé au broyage des lots de diptères. Pour ce faire, ils ont été transférés dans un tube de polycarbonate de 4 ml contenant 300µL de PBS 1X (*Phosphate Buffered Salin*) et une bille en acier (Figure 30). Les tubes ont été placés dans un broyeur électrique (*Genogrinder 2000 Spex Centripep*) (Figure 30) pendant 2 minutes à 1500 coups/min. Chaque broyat a été divisé en trois aliquotes de 100µL destinées au criblage de parasites, au criblage de virus et de bactéries, et à une sauvegarde.



**Figure 30** : Outils de broyage du matériel biologique  
(tubes de broyage et broyeur)

##### 4.4.1. Criblage de parasites hémospories

Afin de réaliser le criblage de parasites hémospories, nous avons dans un premier temps procédé à l'extraction de l'Acide Désoxyribonucléique (ADN) à partir des broyats de diptères à l'aide du kit commercial *QIAGEN DNeasy® Blood and Tissue* en suivant les instructions du fabricant (Annexe 2). Nous avons ensuite procédé à

l'amplification PCR (Polymerase Chain Reaction) d'une région conservée de 835 paires de bases (pb) de gène mitochondrial Cytochrome b (*Cyt b*) d'hémosporidies. Nous avons utilisé un protocole de PCR nichée (nested-PCR, de l'anglais *nested-Polymerase Chain Reaction*) suivant une procédure expérimentale réalisée en routine au laboratoire (Prugnotte et al., 2010) avec les couples d'amorces *DW2* (5'-CGGTCGCGTCCGGTAGCGTCTAATGCCTAGACGTATTCCTGATTATCCAG-3') et *DW4* (5'-CGCATCACCTCTGGGCCGCGTGT-TTGCTTGGGAGCTGTAATCATAATGTG-3'), pour la première PCR, puis le couple d'amorces *CytbF* (5'-TCCAGGTAAAGATAATGGCCC-3') et *CytbR* (5'-TCAGTTTTTCGGCTTACAGG-AC-3') pour la deuxième (Annexe 3). La réaction de PCR a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur *GeneAmp PCR System 9700* (*Applied Biosystems*) selon le profil d'amplification précisé en Annexe 3. Les produits d'amplification ont été visualisés après migration électrophorétique sur gel d'agarose 1,5% en TBE 1X (Tris Borate Ethylène Diamine Tetra Acétique). Les amplicons des échantillons positifs ont été envoyés à Beckman Coulter Genomics (France) pour procéder à un séquençage dans les deux sens avec le couple d'amorce utilisé lors de la nested-PCR.

Les séquences obtenues ont été traitées (correction, nettoyage, alignement, recherche d'homologie avec des séquences de référence dans la base de données *GenBank*) *in silico* à l'aide du logiciel *Geneious version 7.0.6* (*Biomatters*, <http://www.geneious.com>) et de *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*). Les séquences ont alors été utilisées pour une analyse phylogénétique en construisant un arbre phylogénétique par maximum de vraisemblance (ML, de l'anglais *Maximum Likelihood*) sur 835 pb avec un set de séquences de la région *Cyt b* d'hémosporidies précédemment publiées et disponibles pour l'assignation du genre. Pour l'assignation des espèces de parasites, nous avons aligné nos séquences avec un set de séquences correspondant à la région *Cyt b* des parasites du genre *Polychromophilus*. Cependant l'alignement résultant n'était que de 314 pb. Le meilleur modèle pour la construction

des arbres phylogénétique sous l'AIC a été le modèle GTR (General Time Reversible) +  $\Upsilon$  (distribution gamma) + I (distribution de site invariable) tel qu'identifié par le test du choix de modèle (Posada and Crandall, 1998). L'arbre phylogénétique a été obtenu sur la base de 100 réplifications (*bootstrap*) avec le programme *PhyML* (Guindon et al., 2010) disponible en accès libre sur <http://www.atgc-montpellier.fr>.

Nous avons calculé les taux d'infection des diptères criblés (pourcentage de lots de diptères infectés sur le nombre total de pools criblés). Nous avons ensuite estimé ces taux d'infection corrigés en réalisant l'estimation de vraisemblance maximale de ces taux d'infection (MLE-IR, de l'anglais *Maximum Likelihood Estimates of Infection Rate*) à un seuil de confiance de 99% en utilisant le programme MLE-IR (Gu et al., 2004). Le MLE-IR est une estimation corrigée du taux d'infection qui prend en compte le nombre d'individus de diptères présents dans chaque lot. Par exemple le MLE-IR d'une espèce d'insecte donnée doit être compris comme le pourcentage d'individus infectés sur l'ensemble des individus constitutifs des lots de cette espèce ayant été criblés.

#### 4.4.2. Criblage viral et bactérien

Nous avons réalisé le criblage de virus et de bactéries en utilisant une approche transcriptomique par séquençage de nouvelle génération (ou séquençage à haut débit en abrégé *NGS*, de l'anglais *Next Generation Sequencing*). Nous avons tout d'abord procédé à la purification des ARNs que nous avons extrait de 32 lots de diptères (24 lots de Culicidae, dont 22 lots mono-spécifiques et 2 lots mixtes ; 6 lots de Phlebotominae tous mono-spécifiques ; et 2 lots de Ceratopogonidae tous mono-spécifiques). Les lots de diptères étaient constitués au maximum de 100 individus provenant uniquement des grottes de Kessipoughou et de Djibilong. L'extraction des ARNs a été réalisée à l'aide du kit commercial *QIAGEN RNeasy*<sup>®</sup> en utilisant l'extracteur automatique *QIAcube* (*QIAGEN*) suivant les recommandations du



fabricant (Annexe 4). Après extraction, les ARNs ont été traités à la DNase à l'aide du kit commercial *TURBO DNA-free<sup>TM</sup>* (*Thermo Fisher*) afin d'éliminer toute trace éventuelle d'ADN dans les produits d'extraction (Annexe 5). Nous avons ensuite quantifié les ARNs traités à l'aide du kit commercial *Qubit<sup>®</sup> RNA HS Assay* en utilisant le fluoromètre *Qubit<sup>®</sup>* (*Molecular Probes Life Technologies*) (Annexe 6).

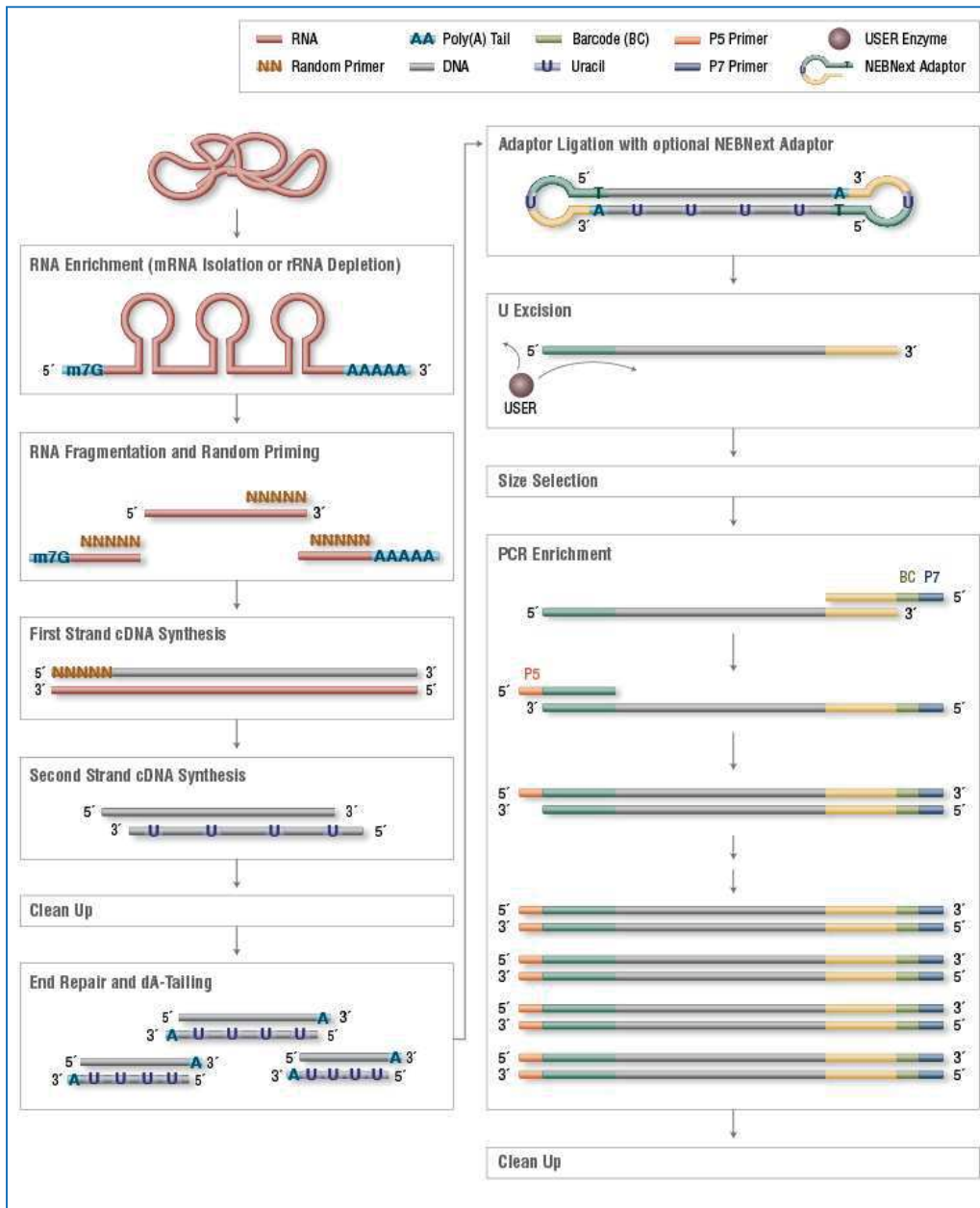
Pour réaliser le séquençage nous avons procédé tout d'abord à la synthèse des librairies à partir de 10ng des 28 échantillons d'ARN extraits (Figure 31). Les librairies ont été préparées à l'aide du kit *NEBNext<sup>®</sup> Ultra<sup>TM</sup>* (*Illumina<sup>®</sup>*) en suivant les recommandations du fabricant (Annexe 7). Cette préparation se résume en différentes étapes comprenant 1) une fragmentation partielle de l'ARN ; 2) la synthèse des brins complémentaires d'ADNc à partir des ARNs fragmentés, puis la synthèse des brins complémentaires d'ADN à partir des brins d'ADNc et ; 3) la ligation des adaptateurs *NEBNext* aux extrémités des ADN double-brins suivie d'une amplification de ces fragments pour constituer les librairies finales prêtes à être séquencées. Le séquençage des librairies a été réalisé sur 75 cycles en utilisant un séquenceur *Nextseq* (*Illumina<sup>®</sup>*).

Après le séquençage des librairies, nous avons procédé à l'analyse bioinformatique des données produites afin de mettre en évidence des agents infectieux (virus et bactéries) présents dans nos échantillons d'étude. Pour cette analyse nous avons utilisé deux approches complémentaires d'assignation taxonomique :

- l'approche par le logiciel *Empowering the Development of Genomics Expertise* (*EDGE*, <http://lanl-bioinformatics.github.io/EDGE/>) pour l'exploration du bactériome qui, après la réalisation des étapes de « trimming » (nettoyage des reads par restriction des fragments correspondant aux adaptateurs de séquençage), utilise un système d'assignation taxonomique basé sur le « mapping » des reads contre les banques de séquences (disponibles sur le site du *NCBI* : *National Center for*

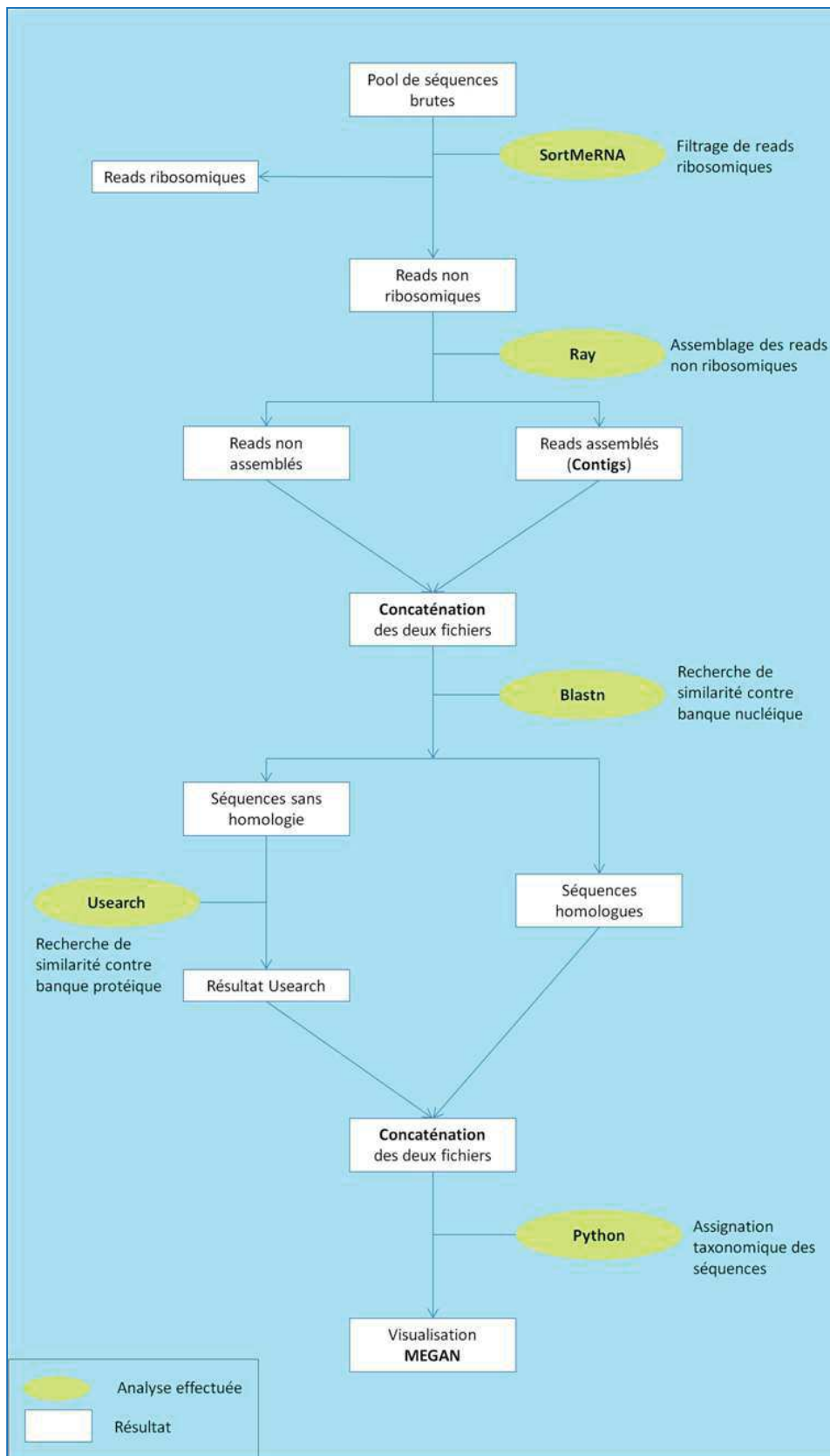


*Biotechnology Information*), à l'aide de l'outil *Burrows-Wheeler Aligner* (*BWA*, <http://bio-bwa.sourceforge.net>).



**Figure 31 :** Processus de synthèse des bibliothèques par le protocole *NEBNext* (source : <https://www.neb.com/>)

- l'approche par l'algorithme « METATAX » développé par notre équipe de recherche pour l'exploration du virome (Figure 32). Cet algorithme repose tout d'abord sur le filtrage des séquences d'ARNs ribosomiques (comprenant les séquences de diptères) et la récupération de toutes les séquences d'ARNs non ribosomiques pour la suite de l'analyse à l'aide du programme *SortMeRNA* (<https://github.com/biocore/sortmerna/release>). Il procède ensuite à l'assemblage *de novo* des séquences générées en séquences consensus de longueurs variables à l'aide du programme *Ray* ([sebhtml.github.io/Ray.web/](http://sebhtml.github.io/Ray.web/)), puis à l'alignement des séquences consensus ainsi que celles n'ayant pas été assemblées contre des banques de séquences nucléotidiques et protéiques d'agents infectieux référencées dans la base de données du *NCBI* en utilisant les outils *Basic Local Alignment Search Tool*® (*BLAST*, [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)) et *Usearch* ([www.drive5.com/usearch](http://www.drive5.com/usearch)). Enfin l'algorithme procède à l'assignation taxonomique des séquences générées à l'aide d'une programmation *Python* ([www.python.org](http://www.python.org)).



**Figure 32** : Pipeline METATAX : schématisation de l'analyse bioinformatique ayant servi à l'assignation taxonomique des séquences obtenues



## Chapitre 5

# Exploration de la diversité des diptères hématophages libres des grottes du Gabon

*Ce chapitre, objet de l'article N°2 de cette thèse, intitulé " Exploring the diversity of blood-sucking Diptera in caves of Central Africa" (soumis à Scientific Reports), expose les résultats obtenus sur l'étude du peuplement cavernicole de l'entomofaune hématophage restreinte aux familles ou sous-famille des Culicidae, Phlebotominae et Ceratopogonidae dans six grottes du Gabon que nous avons explorées. Ce chapitre présente de façon résumée le contexte de cette étude, rappelle les points clés de la procédure expérimentale, et met en lumière les principaux résultats observés sur l'analyse des communautés rencontrées, notamment leur diversité et leur dynamique temporelle en lien avec quelques paramètres environnementaux. Le chapitre s'achève sur quelques réflexions au regard des espèces retrouvées et de leur rôle potentiel dans les cycles d'agents infectieux zoonotiques.*



A licence free image from CDC/Science Photo Library

## 5.1. Contexte

Les grottes hébergent une variété de micro-organismes infectieux, incluant des bactéries et champignons opportunistes (Jurado et al., 2010; Saiz-Jimenez, 2012) et divers agents infectieux à potentiel zoonotique parmi les virus et les parasites protozoaires (Adam and Landau, 1973a-b; Anti et al., 2015b; Bausch et al., 2006; Diallo et al., 1999; Konstantinov et al., 2006; Maganga et al., 2011). L'anthropisation croissante des grottes (tourisme, exploitation minière, activités spirituelles, etc.) augmente le contact des populations humaines avec les grottes, et par conséquent augmente potentiellement le risque de transferts de pathogènes zoonotiques pouvant et leur émergence en milieu anthropique (Anti et al., 2015b). Certains de ces agents infectieux infectent les vertébrés cavernicoles, et en particulier les chauve-souris, dont la transmission requiert des arthropodes vecteurs (Adam, 1965a; Adam and Landau, 1973b; Reeves et al., 2005; Thompson et al., 2015). En Afrique, plusieurs études ont identifié les moustiques (Culicidae), les phlébotomes (Phlebotominae) et les cératopogonides (Ceratopogonidae) comme leurs principaux vecteurs potentiels (Adam, 1965b, 1967; Vattier-Bernard and Adam, 1969). Cependant, pour mieux comprendre leur éventuelle implication comme vecteurs, il est d'une importance capitale de les caractériser. Au Gabon (Afrique Centrale), plusieurs grottes ont été recensées la plupart d'entre-elles faisant l'objet d'une anthropisation. Cependant, à l'exception de quelques reports d'espèces, les connaissances sur les communautés de diptères d'intérêt médico-vétérinaire, en particulier concernant leur diversité, leur biologie, ou leurs dynamiques populationnelles restent encore très limitées. Aussi avons-nous entrepris des enquêtes entomologiques focalisées sur les Culicidae, Phlebotominae et Ceratopogonidae dans quelques grottes à travers le Gabon, incluant des cavités dans lesquelles la circulation d'agents infectieux a été mise en évidence (Duval et al., 2012; Maganga et al., 2011). La diversité et la dynamique des populations des espèces retrouvées ont été mises en relation avec certains paramètres

environnementaux tels que la pluviométrie extérieure et l'abondance de chauves-souris.

## 5.2. Procédure expérimentale

Nous avons collecté les moustiques, les phlébotomes et les cératopogonides au cours de captures transversales dans les grottes du Faucon, de Zadié, de Siyou et d'Itsoulou, et longitudinales sur onze mois dans les grottes de Kessipoughou et de Djibilong à l'aide de pièges lumineux de type CDC (cf 4.2.1. p. 106). Durant les différentes sessions de capture, les pièges étaient relevés après chaque 24 heures, et les diptères identifiés à la loupe binoculaire (moustiques) et au microscope photonique (phlébotomes et cératopogonides).

Nous avons réalisé des inventaires taxonomiques et procédé à l'analyse des communautés de diptères (richesse spécifique, densités apparentes, indice de diversité, indice de dominance, indice de similarité entre grottes, dynamique populationnelle et relation avec la pluviométrie extérieure) l'aide du logiciel de statistique *R* (version 3.0.2) en utilisant les packages *vegan* et *lme4*.

## 5.3. Résultats

Nos captures ont permis de collecter 4395 moustiques, 4449 phlébotomes et 363 cératopogonides sur l'ensemble des grottes. Les densités de diptères les plus élevées ont été observées dans les grottes du Faucon (en moyenne 39,5 spécimens par piège et par jour), de Djibilong (en moyenne 4,8 spécimens par piège et par jour) et de Kessipoughou (en moyenne 1,1 spécimens par piège et par jour) pour les moustiques, les phlébotomes et les cératopogonides respectivement. Indépendamment de l'effort d'échantillonnage réalisé dans chaque grotte, la richesse spécifique des moustiques et

des phlébotomes s'est révélée être la plus grande dans la grotte de Djibilong (40 espèces de moustiques et 7 espèces de phlébotomes) et la moins élevée dans la grotte du Faucon (3 espèces de moustiques et aucune espèce de phlébotome trouvée). Cependant les cératopogonides n'ont été retrouvés que dans les grottes de Djibilong (5 taxons) et Kessipoughou (2 taxons).

Pour évaluer la représentativité de notre échantillonnage dans les grottes où nous avons réalisé le suivi longitudinal, nous avons construit des courbes d'accumulation d'espèces. Ces dernières ont indiqué, en dehors des moustiques à Djibilong (où le nombre d'espèces non échantillonnées a été estimé à 13,1), que nos échantillonnages étaient représentatifs de la composition des espèces retrouvées dans ces grottes. Ainsi nous avons recensé un total de 68 espèces dont 43 n'avaient jamais été signalées au Gabon. En fonction des groupes, nous avons recensé 1) 52 espèces de moustiques réparties en 12 genres (dont 30 étaient nouvelles); 2) 11 espèces de phlébotomes réparties en 4 genres (dont 8 étaient nouvelles); 3) et 5 espèces de cératopogonides réparties en 2 genres (toutes nouvelles pour le Gabon). Toutes les grottes confondues, les assemblages d'espèces de moustiques étaient dominés par *Uranotaenia nigromaculata* Edwards, *Anopheles smithii* s.l. Theobald, le groupe *Culex rima* Theobald et *Culex quasiguiarti* Theobald. *Spelaeophlebotomus gigas* Parrot & Schwetz et *Spelaeomyia emilii* Vattier-Bernard dominaient les assemblages de phlébotomes, alors que les *Culicoides* du groupe *trifasciellus* Goetghebuer et *Culicoides fulvithorax* Austen dominaient ceux des cératopogonides. Les diversités en espèces de moustiques se sont avérées les plus fortes dans les grottes de Djibilong ( $S = 40$ ,  $H = 1.1$ ) et de Siyou ( $S = 9$ ,  $H = 0.8$ ) et la plus faible dans celle du Faucon ( $S = 3$ ,  $H = 0,1$ ). Pour les phlébotomes les indices de diversité étaient les plus grands dans les grottes de Djibilong ( $S = 7$ ,  $H = 0.6$ ) et de Zadié ( $S = 5$ ,  $H = 0.6$ ) et les plus faibles à Kessipoughou ( $S = 6$ ,  $H = 0.09$ ). Pour les cératopogonides les indices



étaient maximums à Djibilong également ( $S = 5$ ,  $H = 0.6$ ). La diversité et l'abondance des diptères ont montré des variations significatives au cours du temps associées avec des changements importants dans la composition des espèces, et dans les patrons de dominance. Ces variations se sont révélées significativement liées à la pluviométrie extérieure.

#### 5.4. Conclusions

Avant la présente étude, les connaissances des espèces de diptères hématophages colonisant les écosystèmes cavernicoles du Gabon étaient très limités et ne concernaient que quelques taxons de moustiques (complexe *An. smithii s.l.* et du genre *Culex* au Faucon), de cératopogonides (*C. brosetti* rapportées au Faucon) et de phlébotomes (*Sl. gigas*, signalée dans la grotte de Zadié) (Adam, 1966; Vattier-Bernard and Adam, 1966a). Notre étude a donc considérablement enrichi la liste des espèces connues de diptères hématophages cavernicoles du Gabon. Ces espèces sont dans leur majorité nouvelles pour le Gabon, cependant un certain nombre d'entre elles avaient déjà été signalées au Gabon en milieux épigés (Service, 1976). Nos résultats ont montré que nos inventaires étaient hautement représentatifs des communautés de Culicidae, Phlebotominae et Ceratopogonidae vivant dans les grottes prospectées, à l'exception des Culicidae de la grotte de Zadié (probablement à cause du faible nombre d'individus collectés) et de Djibilong (où nous avons estimé un nombre important d'espèces « non vues »). À ce jour, peu d'études en Afrique se sont intéressées à la diversité des insectes hématophages cavernicoles, et seule une quinzaine d'espèces hématophages (contre plus de 50 au Gabon dans 6 grottes), dominées exclusivement par les Culicidae des genres *Anopheles* et *Uranotaenia*, et quelques espèces de Phlebotominae et Ceratopogonidae, avaient été reportées

particulièrement de la République du Congo (16 grottes étudiées) (Adam et al., 1967; Vattier-Bernard, 1970a; Vattier-Bernard and Adam, 1966b).

Nos observations ont révélé que les grottes étaient colonisées principalement par des espèces troglaphiles (espèces vivant à tous les stades dans les grottes, mais dont la présence en milieu épigé n'est nullement exclue) et troglaxènes (espèces des milieux épigés utilisant les grottes occasionnellement, généralement pour des raisons physiologiques). En dépit de l'existence de certaines espèces communes à toutes les grottes, les communautés demeurent singulières de chacune d'entre-elles. Les variations de l'abondance et la diversité des diptères associées à la pluviométrie ont semblé être significativement modulées par l'hétérogénéité et les conditions environnementales spécifiques régnant dans chacune des grottes.

Au vu des nombreuses espèces de diptères hématophages retrouvées dans les grottes, il est plausible de considérer que certaines puissent être impliquées dans la transmission d'agents infectieux. Leur criblage paraît de ce fait justifié.

## Article 2

# Exploring the diversity of blood-sucking Diptera in caves of Central Africa

Judicaël Obame-Nkoghe<sup>1,2\*</sup>, Nil Rahola<sup>1,2</sup>, Diego Ayala<sup>1,2</sup>, Patrick Yangari<sup>2</sup>, Davy Jiolle<sup>1,2</sup>, Xavier Allene<sup>3</sup>, Mathieu Bourgarel<sup>3</sup>, Gael Darren Maganga<sup>2</sup>, Nicolas Berthet<sup>2</sup>, Eric-Maurice Leroy<sup>1,2</sup>, and Christophe Paupy<sup>1,2\*</sup>

Authors' affiliations:

3. Laboratoire MIVEGEC, UMR 224-5290 CNRS-IRD-UM, IRD Montpellier, France
4. Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF), Franceville, Gabon
5. Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), UMR15 Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes, Montpellier, France
6. CIRAD, UPR AGIRS, Montpellier, France.
7. Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), Montpellier, France

\*Correspondences should be addressed to [judicael.obame@live.fr](mailto:judicael.obame@live.fr) and [christophe.paupy@ird.fr](mailto:christophe.paupy@ird.fr)

## Abstract

Caves house pathogenic microorganisms, some of which are transmitted by blood-sucking arthropods. In Africa, previous studies identified mosquitoes, sand flies and biting midges as the main potential vectors of cave-dwelling pathogens. However, to understand their involvement in pathogen transmission, it is crucial to characterize their community composition and dynamics. Using CDC light traps, we collected hematophagous Diptera in six caves of Gabon during one-shot or longitudinal sampling, and investigated their species diversity and dynamics in relation with external rainfall. Overall, we identified 68 species of mosquitoes, sand flies and biting midges, including 45 new records for Gabon. The dominant species were: *Uranotaenia nigromaculata*, *Anopheles smithii* s.l., *Culex. rima* group and *Culex quasiguiarti* for mosquitoes, *Spelaeophlebotomus gigas* and *Spelaeomyia emilii* for sand flies and the *Culicoides trifasciellus* group and *Culicoides fulvithorax* for biting midges. The survey revealed that species assemblages were cave-specific and included mainly troglophilous and trogloxenous species. Both diversity and abundance varied according to the cave and sampling time and were significantly associated with rainfall. These associations were modulated by the cave specific environmental conditions. Moreover, the presence of trogloxenous and troglophilous species could be of high significance for pathogen transfers between cave and epigeous reservoirs.

**Keywords:** Diptera, Mosquitoes, Sand flies, Biting midges, Diversity, Caves, Gabon, Central Africa.

## Introduction

Cave ecosystems house many different pathogenic microorganisms, including opportunist pathogens including viruses, Haemosporidia, Trypanosomatida, bacteria and fungi <sup>1-5</sup> that infect cave-dwelling vertebrates, especially bats <sup>6-10</sup>. Some of them require blood-sucking arthropod vectors for their transmission <sup>11-14</sup>. In Africa, the growing anthropization of caves (for mining, tourism, resource gathering or spiritual purposes) has increased the risk of spillover of emerging pathogens that naturally infect the fauna living inside the caves <sup>6</sup>. Studies carried out in African caves have helped inventorying the main potential vectors among mosquitoes (Culicidae), sand flies (Phlebotominae) and biting midges (Ceratopogonidae) <sup>15-17</sup>. Several cavernicolous mosquito species from the *Anopheles* (*An.*) and *Uranotaenia* (*Ur.*) genera, such as *An. vanhoufi* Wanson & Lebieu, *An. rodhaini* Leleup & Lips, *An. faini* Leleup, *An. cavernicolus* Abonnenc, *An. vanthieli* Laarman, *An. caroni* Adam, *An. smithii*, *Ur. cavernicola* Mattingly, have been described <sup>15</sup>. Similarly, five sand flies species belonging to the *Spelaeophlebotomus* (*Sl.*) Theodor, *Phlebotomus* (*Ph.*) Loew and *Spelaeomyia* (*Sa.*) Theodor genera have been reported in Afrotropical caves, including *Sl. gigas* Parrot & Schewtz, *Sa. mirabilis* Parrot & Wanson, *Ph. balmicola* Abonnenc, *Sa. moucheti* Vattier-Bernard & Abonnenc and *Sa. emilii* Parrot and Wanson <sup>18</sup>. Conversely, little is known about cavernicolous biting midges. To date, only three species of the *Culicoides* genus (a genus that includes the predominant biting midges species known to

be both hematophagous and potential vectors of pathogens <sup>19</sup>) have been reported in African caves: *C. grenieri* Vattier-Bernard & Adam, *C. rageaui* Vattier-Bernard & Adam and *C. brosetti* Vattier-Bernard & Adam <sup>20,21</sup>. Although it has been suggested that these blood-sucking Diptera (mosquitoes, sand flies and biting midges) are potential important actors in the spillover of emerging diseases <sup>22</sup>, their role in pathogen epidemiology within cave ecosystems has rarely been investigated.

In Gabon, blood-sucking mosquitoes, sand flies and biting midges have previously been studied. With about 100 species known, mosquitoes are the more documented taxa <sup>23</sup>. However, biting midges, with 6 species reported (*C. austeni* Carter, *C. brosetti*, *C. brucei* Austen, *C. grahamii* Austen, *C. jouberti* Huttel, Huttel & Verdier, *C. tristanii* Huttel, Huttel & Verdier) <sup>24</sup> and sand flies, with only 5 species reported (*Sl. gigas*, *Sergentomyia antennata* Newstead, *Se. schwetzi* Adler, Theodor & Parrot, *Se. africana* Newstead, *Ph. multihamatus* Rahola et al.) <sup>25</sup> remain largely underdocumented. In caves, blood-sucking dipterans have occasionally been studied but only in region of Belinga mountains (North-east of the country). Therefore, except for the report of two mosquitoes (*An. smithii* s.l., *Culex* sp. in Faucon cave), one sand fly (*Sl. gigas* in Zadie cave) and one biting midge (*C. brosetti* in Faucon cave) species <sup>20,26</sup>, data on the diversity of cavernicolous insects of medical or of veterinary interests are very limited. Moreover, almost nothing is known about their biology, population dynamics and community structure. To fill this gap, we

performed an entomological survey in several caves of Gabon (Fig. 1). We focused on the diversity and population dynamics of Culicidae, Phlebotominae and Ceratopogonidae in relation with relevant environmental parameters, particularly external rainfall.

## Results

### *Inventory and diversity of Diptera assemblages*

During the study period, 4395 mosquitoes, 1449 sand flies and 363 biting midges were collected. In each cave, with the exception of Zadie cave where sand flies were predominant, mosquitoes dominated the Diptera assemblages. The highest apparent density ( $AD$ ) of mosquitoes (i.e., number of specimens per trap and per day) was 39.5 in Faucon cave (Table 1). Biting midges were collected only in Kessipoughou and Djibilong caves and showed the lowest  $AD$  values (Table 1).

Mosquitoes belonged to 52 species (including 30 new records for Gabon) from 12 genera, particularly *Anopheles* (*An.*), *Culex* (*Cx.*) and *Uranotaenia* (*Ur.*) (Table 2). Sand flies were from 11 species belonging to four genera: *Spelaophlebotomus* (*Sl.*), *Spelaomyia* (*Sa.*), *Sergentomyia* (*Se.*) and *Phlebotomus* (*Ph.*). Eight of these sand fly species have never been reported in Gabon before. Five biting midges species from the genera *Culicoides* (*C.*) and *Forcipomyia* (*F.*) were collected. All were new records for Gabon.

The number of species collected in the different caves (i.e., species richness  $S$ ) ranged from 3 (Faucon) to 40 (Djibilong) for mosquitoes, from 0 (Faucon) to 7 (Djibilong) for sand flies, and from 0 (all caves, but for Djibilong and Kessipoughou) to 5 (Djibilong)

for biting midges (Table 1). Mosquitoes appeared to be more diversified in the caves of Djibilong ( $S = 40$ , and Shannon diversity index  $H = 1.1$ ) and Siyou ( $S = 9$ ,  $H = 0.8$ ) than in the other caves. The diversity of sand flies was highest in Djibilong ( $S = 7$ ,  $H = 0.6$ ) and Zadie ( $S = 5$ ,  $H = 0.6$ ) and of biting midges in Djibilong cave ( $S = 5$ ,  $H = 0.6$ ).

To assess whether sampling was representative of the species assemblages living in these caves, species accumulation curves (as an estimate of species richness) were plotted for 44 sampling events in the Kessipoughou and Djibilong caves (Fig. 2). Except for mosquitoes in Djibilong cave (Fig.2b), sampling representativeness seemed good for each insect group in both caves. The lack of representativeness for the mosquito community inside Djibilong cave was confirmed by the important number of estimated non-sampled species ( $NS = 13.1$ , Table 1), extrapolated from the Chao index (a species richness estimator) (Chao, 1987). The  $NS$  value is particularly valuable for the caves where insects were collected by one-shot sampling. Indeed, in Zadie cave it was 6.0 for mosquitoes and 8.0 for sand flies, suggesting that a significant number of species escaped capture with our sampling procedure. Conversely, it was zero or close to zero for the other three caves where insects were captured by one-shot sampling (Table 1).

Concerning each Diptera group, species assemblages greatly differed between caves for mosquitoes and biting midges (Morisita-Horn similarity index  $C$  mostly  $<0.5$ ) (Supplementary Table S1), but not for sand flies ( $C >0.6$ ) (Supplementary Table S1). The species composition of communities and also the dominance pattern considerably varied between caves (Table 2). Among mosquitoes,

*An. smithii* s.l. was the most dominant species in Siyou ( $d = 0.37$ ) and Itsoulou ( $d = 0.85$ ), *Ur. nigromaculata* in Kessipoughou ( $d = 0.73$ ), *Cx. quasiguiarti* in Djibilong ( $d = 0.37$ ) and *Cx. rima* group in Faucon ( $d = 0.93$ ). In all caves, *Sl. gigas* was the dominant sand fly species ( $d$  ranged from 0.4 to 1), followed by *Sa. Emilii* ( $d$  ranged from 0 to 0.3), with the exception of Zadie cave where *Se. congolensis* was the second dominant species ( $d = 0.25$ ). Biting midges were represented mainly by the *C. trifasciellus* group in Kessipoughou ( $d = 0.99$ ) and by *C. fulvithorax* in Djibilong cave ( $d = 0.53$ ).

Among all collected mosquitoes, only two species (3.8%; *Ur. cavernicola* and *An. faini*) were previously known to be restricted to caves ecosystems and were defined as “true cavernicolous” (i.e., troglobitic species that spend their entire life cycle exclusively in caves) (Table 2). The proportion of true cavernicolous species was higher among the collected sand flies (4/11; 36.3%; *Sl. gigas*, *Sa. emilii*, *Sa. moucheti* and *Se. balmicola*) (Table 2). None of the collected biting midges was previously found in caves.

### ***Spatio-temporal dynamics of***

#### ***Diptera assemblages***

Comparison of the  $H$  values for the three Diptera groups collected by longitudinal sampling showed that diversity was significantly higher in Djibilong than in Kessipoughou cave (supplementary Fig. S1). Analysis of the community dynamics of each Diptera group in both caves revealed major density variations along time (Fig. 3). Although mosquitoes were sampled in both caves throughout the year, the highest densities were observed between July and October in Kessipoughou (Fig. 3a1), and

between May and July in Djibilong cave (Fig. 3b1). Moreover, the species composition of mosquito assemblages in both caves varied over time and some drastic shifts in species dominance were observed (Fig. 4). In Kessipoughou cave, *Ur. nigromaculata* was the predominant species from May 2012 to March 2013 and then was overtaken by *Ur. cavernicola* in April 2013 (Fig. 4a1). In Djibilong cave, *Cx. quasiguiarti* was predominant from May 2012 to October 2012, *Ur. nigromaculata* in December 2012, and the *Cx. rima* group from January 2012 to April 2013 (Fig. 4b1). Conversely, the diversity of mosquito species (mean  $H$  value) varied significantly over time only in Djibilong cave (Supplementary Fig. S2). Rainfall was negatively associated with mosquito diversity in Djibilong ( $t$ -value = -3.3,  $p = 0.0008$ ) and with mosquito density in Kessipoughou cave ( $t$ -value = -3.6,  $p = 0.0004$ ).

Sand flies also were collected in both caves throughout the year; however, their density was higher from July to September and in March in Kessipoughou cave (Fig. 3a2) and from June to July and in January in Djibilong cave (Fig. 3b2). *Sl. gigas* was the predominant species during the entire survey period in Kessipoughou cave (Fig. 4a2). Conversely, a more complex dominance pattern with dominance shifts of *Sl. gigas*, *Ph. rodhaini* and *Sa. emilii* was observed in Djibilong cave (Fig. 4b2). Sand fly diversity (mean  $H$  value) did not significantly change over time in both caves (Supplementary Fig. S2). In Djibilong cave, rainfall was negatively associated with sand fly density ( $t$ -value = -2.9,  $p = 0.003$ ).

The density of biting midges also varied over time in both caves with peaks of abundance in July, September and January in Kessipoughou (Fig. 3a3), and in May and



March in Djibilong cave (Fig. 3b3). In Kessipoughou cave, members of the *C. trifasciellus* group were predominant all year around, except in April when they were overtaken by *Forcipomyia* sp. (Fig. 4a3). In Djibilong cave, no significant species predominance was detected during the entire survey (Fig. 4b3). The mean *H* value of biting midges did not significantly change over time in both caves (Supplementary Fig. S2) and no significant association between biting midge density/diversity and rainfall was observed.

## Discussion

In all the caves we investigated in Gabon, except in Zadie cave, Diptera assemblages were always dominated by mosquitoes. This observation suggests these caves offer conditions that are suitable particularly for mosquito development. In Zadie cave sand flies were the most abundant compared to the other Diptera groups.

It suggests that microenvironmental conditions within this cave are less suitable for mosquitoes or biting midges than for sand flies, as previously observed<sup>26</sup>. We also observed Zadie is relatively drier than the other explored caves, with few potential breeding sites for mosquitoes or biting midges (for which immature stages need humid substratum), whereas sand flies could easily breed on the powdery substratum in spite of a low relative humidity<sup>26</sup>.

In all the caves that we explored, we collected Ceratopogonidae. However, blood-feeding species (i.e., belonging to genera *Culicoides* and *Forcipomyia*) were only recorded in Kessipoughou and Djibilong caves. A previous study reported *Culicoides brosetti*

(species belonging to the *Culicoides trifasciellus* group) in the deepest zone of the Faucon cave<sup>20</sup>. In our study, we did not observe *C. brosetti* or *C. brosetti*-like in the Faucon cave (where we conducted one-shot sampling in January and February). It could be possible that the period of our sampling in the Faucon cave was not the right to observe *C. trifasciellus* group (i.e., *C. brosetti* or *C. brosetti*-like), explaining its absence in our results. However, despite longitudinal captures in Kessipoughou and Djibilong caves, we still observed a very low density of blood-feeding Ceratopogonidae compared to mosquitoes and sand flies. Then, blood-feeding Ceratopogonidae (e.g., *C. trifasciellus* group) could exist in caves out of Kessipoughou and Djibilong, but in low density. Captures carried out in these caves in the right periods, could allow some records.

Our study allowed to significantly increase the number of species known in Gabon. Indeed our work adds 50 Culicidae species (including 30 new records for Gabon) to the two previously known mosquito species collected in Gabonese caves. *Ur. nigromaculata* and the *Cx. rima* group dominated the mosquito species assemblages. Similarly, we found 11 species of sand flies (including 8 new records for Gabon) in these caves, over only five species previously known in Gabon<sup>25</sup>, but *Sl. gigas* was the dominant one. Finally, the community of cavernicolous biting midges included five taxa, all new for the country and dominated by the *C. trifasciellus* group.

Some of the species reported here have been previously found in caves of other African countries. For instance, the mosquito



species *Ur. cavernicola*, *An. smithii s.l.* and *An. faini* have been previously collected in caves of Democratic Republic of Congo and Cameroon <sup>12,15,28,29</sup>. Similarly, among the identified sand fly species, *Sl. gigas* is widely distributed throughout Africa, whereas *Sa. emilii* have been previously recorded in Congo-Brazzaville, Cameroon and Gabon, *Se. balmicola* in Congo-Brazzaville, Cameroon and Gabon, and *Sa. moucheti* in Cameroon, Central African Republic and Gabon <sup>17,30</sup>. Conversely, the two biting midge species we detected (*C. grenieri* and *C. rageaui*) have never been reported in African caves before <sup>21</sup>. Our analysis (particularly, species accumulation curves and NS values) suggests that sampling was exhaustive for all Diptera groups and in all caves, except for mosquitoes in Zadie cave, probably due to the low number of captured individuals, and in Djibilong cave where the extrapolated number of non-sampled species was quite important. Thus, with more than 50% of all known mosquito species in Gabon (in any ecosystems) and several new records of sand flies and biting midges, this study improves the knowledge about cavernicolous blood-sucking Diptera in Gabon and in Central Africa.

We observed that the Kessipoughou cave is a very deep cave, less opened to the outside. In the Kessipoughou cave, there is several mosquito breeding sites and large colonies of bats (potential major blood source) favoring the development of only few potentially well adapted trogliphilic or troglobitic species, explaining the high density and the low diversity observed. However, the Djibilong cave is less deep, and more opened to the outside, favoring the entrance of several

species from the outside environment and explaining the high diversity observed. These differences of habitats could explain the difference of the mosquito assemblage observed between the two caves. In this study, potential true cavernicolous (troglobitic) species were generally in minority compared to the other species. Indeed, the proportion of previously known true cavernicolous species was very low (3.8%) for mosquitoes and low (36.3%) for sand flies. *Anopheles smithii s.l.* was known to be restricted to caves, although it has been occasionally recorded inside human habitations in Koulamoutou, Gabon <sup>31</sup>. Some species from epigeous environments showed high densities inside the six caves under study (*Ur. nigromaculata*, *Cx. rima* group and *Cx. quasiguiarti* among mosquitoes; *Ph. rodhaini* and *Se. congolensis* among sand flies; *C. trifasciellus* group among biting midges), suggesting that they breed in this environment. Therefore, these opportunistic species could be considered as trogliphilous (i.e., capable of breeding in epigeous and also in cavernicolous environments). More accurate investigations, including larval surveys and feeding behavior studies, should allow better determination of their cavernicolous status. Besides these species, all the others, including biting midges, have been previously recorded only in epigeous habitats <sup>32-42</sup>, suggesting that they are trogloxenous (i.e., living and breeding outside caves) and use cave temporarily to rest (adults) or to seek cavernicolous hosts. The presence inside caves of many trogloxenous and trogliphilous species that could move between the inside of the caves and the outside environment might favor the externalization of pathogens that infect cave-dwelling hosts (e.g., bats) and their transfer (through bridge vectors) to animals or

humans living in the surroundings of caves, or animals living in different caves (e.g. populations of bat using different caves). Indeed, the Siyou and Itsoulou caves are very close to Lastoursville, and Djibilong cave is located within a ranch. Therefore, they represent favorable contexts for the spillover of cave-dwelling Diptera-borne zoonotic pathogens to humans or livestock through bridge vectors.

Our results show that sand fly assemblages were mainly composed of troglophilous or troglobitic species<sup>43</sup> and were similar between caves, except for couple of caves involving the Faucon cave (no sand fly was recovered). It suggests that the internal micro-environmental conditions (e.g., cave physical nature and breeding site types and densities) required for the development of cavernicolous sand flies might be comparable in all the studied caves, except for the Faucon cave, which presents very different micro-climatic conditions compared to the other caves<sup>44</sup>. Conversely, the assemblages of mosquito and biting midge species were cave-specific, suggesting micro-environmental conditions required for their presence and/or their development may differ between caves. As these assemblages includes trogloxenous and troglophilous species, variations in the external environmental conditions might affect the nature of the Diptera community around each cave and consequently, also the composition of the communities within each cave.

Moreover, longitudinal sampling revealed significant quantitative and qualitative fluctuations in both mosquito and sand fly assemblages over time. This generates shifts of species dominance that could be explained by

micro-environmental changes within (e.g., nature and availability of larval breeding sites for true cavernicolous species) and in the surroundings of the caves (trogloxenous species).

In Kessipoughou cave, rainfall was negatively associated with mosquito density. In this cave, dominated by true cavernicolous species, mosquito larvae mainly breed in small water rock-pools along the riverbanks (personal observation). During periods of heavy rainfall, the stream level rises and rock-pools containing immature stages are flooded, leading to a decrease of the mosquito population density, as documented in epigeous environments<sup>45-47</sup>. In Djibilong cave, where trogloxenous species represent an important part of the mosquito assemblages, rainfall negatively influenced mosquito diversity rather than density. This could be explained by the fact that external species readily enter during dry periods, probably guided by physiological needs (e.g., for aestivation).

Rainfall also negatively affected sand fly density in Djibilong. For breeding, sand flies need a wet substratum (i.e., moist soil); however in this cave, during the rainy season nearly all the floor surface is flooded (personal observation), thus limiting the number of suitable breeding places and leading to a drop of the population size.

Our analysis also highlights that some Diptera species reach sufficient densities to support the transmission of pathogens inside caves. Only few of them have been previously shown to transmit pathogens in caves. For instance, *An. smithii* *s.l.* ensures the transmission of Plasmodiidae parasites to cave-dwelling vertebrates<sup>48</sup>. Mosquitoes could

also serve as vectors for arboviruses because various species of both genera are known vectors of arboviruses in Africa, such as Rift Valley fever virus, West Nile virus and others<sup>49,50</sup>. Particular attention should be paid to sand flies because in Africa, this group includes vectors of *Leishmania* parasites (particularly the genus *Phlebotomus*<sup>51</sup>) and of viruses of the Bunyaviridae, Rhabdoviridae and Flaviviridae families<sup>52</sup>. Biting midges, which are known vectors of animal pathogens, such as haemosporidian parasites of *Hepatocystis* and *Nycteria* genera and arboviruses of the Reoviridae or Rhabdoviridae families<sup>53,54</sup>, could also serve as vectors in caves. Therefore, it would be interesting to develop research programs to assess the presence of pathogens in cave-dwelling Diptera and to precisely evaluate the medical or veterinary risk related to the anthropization of caves and their surroundings. The evaluation of such risk requires also studying the blood feeding patterns of cavernicolous Diptera, particularly in order to determine whether some species could bite external vertebrate hosts (including humans) within or outside the cave, thus transferring cave-dwelling pathogens. As our study indicates that a significant proportion of Diptera found inside caves are trogloneous and troglophilous, it is now important to assess whether and how these species can bridge pathogens from cavernicolous reservoirs to humans or domestic animals, especially for caves located in inhabited areas, such as Siyou, Itsoulou and Djibilong. Indeed, several of the collected species (at least twenty mosquito species, including *An. funestus*, *An. marshallii*, *An. nili*, *Cx. nebulosus*, *Cx. simpsoni*, *Fi. uniformis*, *Ur. bilineata*, *Ur. caeruleocephala* and *Ur. Mashonaensis*; five

sand fly species: *Sl. gigas*, *Ph. rodhaini*, *Se. bedfordi* group, *Se. ingrami* and *Se. magna*; and all the *Culicoides* species recorded in this study) can feed on a wide range of mammals, including wild or domestic animals and humans<sup>18,40,55-65</sup>.

## Methods

### Study areas

Mosquitoes, sand flies and biting midges were collected inside six caves that are located in the eastern part of Gabon (Fig. 1) and are among the most anthropized in this country, mainly for mining, hunting and tourism purposes. The Faucon (01.07287 N 13.20739 E) and Zadie (00.98595 N 13.19745 E) caves are in the heart of the Belinga rainforest, whereas the Kessipoughou cave (00.86722 S 12.77389 E), which is currently considered one of the biggest known caves in Gabon, is in a forested area in the middle east of the country, near Lastoursville. The Siyou (00.80889 S 12.76334 E) and Itsoulou (00.80639 S 12.77389 E) caves also are in the rainforest around Lastoursville. The Djibilong cave (01.36261 S 13.46296 E) is located in a patch of forest surrounded by savanna, north of Franceville. More details about these caves were previously published (Obame-Nkoghe et al., 2016). All studied caves are characterized by the presence of bat colonies and all of them, except Zadie cave, are crossed by internal free-flowing rivers (Kessipoughou, Itsoulou, Siyou) or contain stagnant water ponds of variable size and depth, depending on the season (Djibilong and Faucon). In Zadie cave, the environment is drier because water ingress or seepage is very limited during the rainy seasons.

### *Insect sampling and species identification*

Arthropods were collected using CDC light traps without CO<sub>2</sub> during one-shot sampling in the Faucon, Zadié, Siyou and Itsoulou caves and longitudinal sampling in the Kessipoughou and Djibilong caves. Four (Faucon, Zadié, Siyou and Itsoulou) to five traps (Kessipoughou and Djibilong) were positioned in each cave, taking care to minimize the competition between them. In Kessipoughou and Djibilong, trap positions remained fixed throughout the duration of the longitudinal survey. Traps were turned on during: 1) 48 consecutive hours per month in Faucon, Zadié (January 2011 to February 2011) and Siyou (August 2013); 2) 96 consecutive hours per month in Itsoulou (August 2013) as well as in Kessipoughou and Djibilong (11 months between May 2012 and April 2013). Overall, the total trapping effort was of 11,904 hours. Collection bags were replaced each 24 hours and placed at -20°C for 1 hour to kill the collected insects that were subsequently sorted in mosquitoes, sand flies and biting midges. Mosquitoes were morphologically identified (species or group of species) using “homemade” taxonomic keys based on updates of the Edwards' identification keys for Ethiopian mosquitoes (Edwards, 1941). Species were named according to the on-line list of valid species (<http://mosquito-taxonomic-inventory.info>).

Sand flies and biting midges were morphologically identified by observation of head, wings, genitalia and spermatheca using a microscope. The body parts used for identification were dissected and ephemerally mounted in Marc-André solution (Abonnenc, 1972) heated at 60°C. The taxonomic identification of sand flies and biting midges

was done using the keys for African Phlebotominae (Abonnenc, 1972) and African Ceratopogonidae, respectively (Canute et al., 1971; Cornet, 1981; Glick, 1990).

### *Data analysis*

All statistical analyses were performed using *R* v3.0.2 (<https://www.r-project.org/>). To determine the sampling efficiency in the Kessipoughou and Djibilong caves, species accumulation curves were plotted according to a randomization procedure using the *vegan* package (Oksanen et al., 2013) and by fixing the number of permutations to 1000. The apparent density (*AD*) of insects was estimated for all insect groups as the number of specimens collected per trap and per day (sp/t/d). Species richness (*S*) was determined as the number of insect species collected. In addition to (*S*), the diversity of communities was assessed using the Shannon index (*H*) (Shannon, 1949) calculated with the “*diversity*” command of the *vegan* package. For each cave, the number of non-sampled species (*NS*) was extrapolated by estimating the Chao index (Chao, 1987) using the “*estimateR*” command of the *vegan* package. The dominant species index (*d*) in each group was estimated using the Berger-Parker equation (Magurran, 1988):  $d = N_i/N$ , where  $N_i$  is the number of individuals of the  $i^{\text{th}}$  species and  $N$  the total number of sampled individuals (all species). It ranges from 0 to 1, and *d* values close to 1 indicate high dominance.

To investigate the cave similarity in terms of species composition and density, the Morisita-Horn similarity index (*C*) (Magurran, 2003) between sites was calculated using the “*vegdist*” command of the *vegan* package. Because “*vegdist*” is an analysis of

dissimilarity ( $C'$ ),  $C = 1 - C'$  was used for this study.  $C$  ranges from 0 (0% of similarity) to 1 (100% of identity between sites).

The relationships between monthly rainfall (chosen as environmental variable) and the variations of insect density and diversity indices during the study period were analysed in the Kessipoughou and Djibilong caves. To this aim, Generalized Linear Models (GLM) were fitted with identity links for each insect group using the *lme4* package (Bates et al., 2015) and monthly “rainfall” was used as explanatory variable. The monthly estimates of accumulated precipitations were from the United States Department of Commerce, National Weather Service/Climate Prediction Center (<http://www.cpc.ncep.noaa.gov/products/fews/africa>). Data for each cave were retrieved using their GPS coordinates.

## References

- 1 Jurado, V. *et al.* Pathogenic and opportunistic microorganisms in caves. *International Journal of Speleology* **39**, 15-24 (2010).
- 2 Saiz-Jimenez, C. Microbiological and environmental issues in show caves. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **28**, 2453-2464, doi:10.1007/s11274-012-1070-x (2012).
- 3 Anti, P. *et al.* Human-Bat Interactions in Rural West Africa. *Emerg. Infect. Dis* **21** (2015).
- 4 Bausch, D. G. *et al.* Marburg hemorrhagic fever associated with multiple genetic lineages of virus. *The New England journal of medicine* **355**, 909-919, doi:10.1056/NEJMoa051465 (2006).
- 5 Konstantinov, O. K., Diallo, S. M., Inapogi, A. P., Ba, A. & Kamara, S. K. The mammals of Guinea as reservoirs and carriers of arboviruses. *Med Parazitol (Mosk)* **1**, 34-39 (2006).
- 6 Maganga, G. D. *et al.* Is Marburg virus enzootic in Gabon? *The Journal of infectious diseases* **204 Suppl 3**, S800-803, doi:10.1093/infdis/jir358 (2011).
- 7 Diallo, M., Thonnon, J., Moumouni, T.-L. & Fontenille, D. Vectors of Chikungunya virus in Senegal : current data and transmission cycles *Am J Trop Med Hyg* **60**, 281-286 (1999).
- 8 Reeves, W. K., Loftis, A. D., Gore, J. A. & Dasch, G. A. Molecular evidence for novel bartonella species in *Trichobius major* (Diptera: Streblidae) and *Cimex adjunctus* (Hemiptera: Cimicidae) from two southeastern bat caves, U.S.A. *Journal of vector ecology : journal of the Society for Vector Ecology* **30**, 339-341 (2005).
- 9 Adam, J. P. Transmission d'haemosporidies par des anophèles cavernicoles dans les grottes du Congo (Brazaville). *Bull. Org. mond. Santé* **32**, 598-602 (1965).
- 10 Adam, J. P. Hématozoaires des chiroptères d'Afrique Centrale. *Cah. ORSTOM. Ser. Entomol. Med. Parasitol collection de Référence n° 6075* (1973).
- 11 Thompson, N. N. *et al.* Seroepidemiology of Selected



- Alphaviruses and Flaviviruses in Bats in Trinidad. *Zoonoses and Public Health* **62**, 53-60, doi:10.1111/zph.12118 (2015).
- 12 Landau, I. & Adam, J. P. Two types of schizonts of *Hepaticystis* sp., a parasite of insectivorous bats in the Congo-Brazzaville. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **67**, 6-7 (1973).
- 13 Landau, I. *et al.* Sur le genre *Polychromophilus*. *Annales de Parasitologie* **55**, 13-32 (1980).
- 14 Adam, J. P. Les Culicidae cavernicoles du Congo et de l'Afrique intertropicale. *Annales de Spéléologie* **20** (1965).
- 15 Adam, J. P. Recherches sur les vecteurs de *Plasmodium* de petits mammifères au Congo et Etats voisins d'Afrique équatoriale et contribution à l'étude de la transmission de *Plasmodium chabeaudi* et *yoelii*. *Cah. O.R.S.T.O.M. Sér. Ent. Med Parasitol* N°**11106** (1967).
- 16 Vattier-Bernard, G. & Adam, J. P. Connaissances actuelles sur la répartition géographique des phlébotomes cavernicoles africains; Considérations sur l'habitat et la biologie. *Annales de Speleologie* **24**, 143-161 (1969).
- 17 Vattier-Bernard, G. Notes sur la biologie de deux espèces de phlébotomes cavernicoles africains. *Bull. Soc. Ecol.* **2**, 293-301 (1971).
- 18 Cornet, M. Ceratopogonidae. *Durand Jean-René (ed.), Lévêque Christian (ed.). Flore et faune aquatiques de l'Afrique sahélo-soudanienne : Paris : ORSTOM* **2**, 625-641 (1981).
- 19 Vattier-Bernard, G. & Adam, J. P. Les *Ceratopogonidae* des grottes de la République du Congo *Annales de Speleologie* **21**, 711-773 (1966).
- 20 Grard, G. *et al.* A Novel Rhabdovirus Associated with Acute Hemorrhagic Fever in Central Africa. *Plos Pathogens* **8**, doi:10.1371/journal.ppat.1002924 (2012).
- 21 Adam, J. P. Rapport sur une mission au Gabon pour l'étude préliminaire de la faune de quelques grottes de la région de Makokou (1966).
- 22 Vattier-Bernard, G. & Adam, J. P. Capture de ceratopogonidae (Diptera) dans les grottes de la République Gabonaise. *Cah. ORSTOM. Ser. Entomol. Med. Parasitol*, 21 (1966).
- 23 Duval, L. *et al.* The chiropteran haemosporidian *Polychromophilus melanipherus*: a worldwide species complex restricted to the family Miniopteridae. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **12**, 1558-1566, doi:10.1016/j.meegid.2012.06.006 (2012).
- 24 Chao, A. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability *Biometrics* **43** (1987).
- 25 Gillies, M. T. & De Meillon, B. Anophelinae of Africa south of the

- Sahara (Ethiopian Zoogeographical region). *South African Institute for Medical Research Publication* **54** (1968).
- 26 Mattingly, P. F. Notes on Ethiopian Uranotaenia (*Diptera-Culicidae*) with description of a new species. *Proc. R. Ent. Soc. Lond (B)* **23**, 167-171 (1954).
- 27 Service, M. W. Contribution to the knowledge of the mosquitoes (Diptera, Culicidae) of Gabon. *Cah. ORSTOM. Ser. Entomol. Med. Parasitol* **14**, 259-263 (1976).
- 28 Edwards, F. W. Mosquitoes of the Ethiopian Region. *BRITISH MUSEUM (NATURAL HISTORY), LONDON. 499 PP., ILLUS., 4 PLS.* (1941).
- 29 Bsrat, A. *et al.* Epidemiological study of cutaneous leishmaniasis in Saesie Tsaeda-emba district, eastern Tigray, northern Ethiopia. *Parasites & vectors* **8**, 758-758, doi:10.1186/s13071-015-0758-9 (2015).
- 30 Kan, E., Anjili, C. O., Saini, R. K., Hidaka, T. & Githure, J. I. Phlebotomine sandflies (Diptera : Psychodidae) collected in Mukusu, Machakos District, Kenya and their nocturnal flight activity. *Applied Entomology and Zoology* **39**, 651-659, doi:10.1303/aez.2004.651 (2004).
- 31 Asimeng, E. J. NATURAL HABITATS OF PHLEBOTOMINE SANDFLIES IN NORTHERN NIGERIA. *Insect Sci. Appl.* **13**, 113-119 (1992).
- 32 Depaquit, J. *et al.* Phlebotomine sand flies from Ouagadougou, Burkina Faso: first record of *Phlebotomus* (Larrousius) longicuspis south of the Sahara. *Med. Vet. Entomol.* **19**, 322-325, doi:10.1111/j.1365-2915.2005.00561.x (2005).
- 33 Canute, P., Khamala, M. & Kettle, D. S. The *Culicoides* Latreilles (Diptera : Ceratopogonidae) of East Africa. *Trans. R. ent. Soc. Lond.* **123**, 1-95 (1971).
- 34 Cornet, M. Les *Culicoides* de l'Ouest africain (1ère notes). *Cah. ORSTOM. Ser. Entomol. Med. Parasitol* **7**, 341-364 (1969).
- 35 Cornet, M., Nevill, E. M. & Walker, A. R. Notes sur les *Culicoides* (*Diptera, Ceratopogonidae*) du groupe de *C. milnei* Austen, 1909, en Afrique orientale et australe. *Cah. ORSTOM. Ser. Entomol. Med. Parasitol* **12**, 231-243 (1974).
- 36 Glick, J. I. *Culicoides Biting Midges* (Diptera: Ceratopogonidae) of Kenya. *J. Med. Ent.* **27**, 85-195 (1990).
- 37 Itoua, A., Cornet, M., Vattier-Bernard, G. & Trouillet, J. Les culicoides (Diptera, Ceratopogonidae) d'Afrique Centrale. *Cah. ORSTOM. Ser. Entomol. Med. Parasitol* **numero spécial** (1987).
- 38 Hamon, J. Les moustiques anthropophiles de la région de Bobo-Dioulasso (République de Haute-Volta). Cycle d'agressivité et variations

- saisonniers. *Annales de la Société Entomologique de France* **132** (1963).
- 39 Vattier-Bernard, G. Contribution à l'étude systématique et biologique des phlébotomes cavernicoles en Afrique intertropicale (1ère partie). *Cah. O.R.S.T.O.M. Sér. Ent. med. Parasitol* **3** (1970a).
- 40 Brown, L. & Murray, V. Examining the relationship between infectious diseases and flooding in Europe: A systematic literature review and summary of possible public health interventions. *Disaster Health* **1**, 117-127 (2013).
- 41 Dieng, H. *et al.* The effects of simulated rainfall on immature population dynamics of *Aedes albopictus* and female oviposition. *Int J Bio Met* **56**, 113-120 (2012).
- 42 Roiz, D., Ruiz, S., Soriguer, R. & Figuerola, J. Landscape Effects on the Presence, Abundance and Diversity of Mosquitoes in Mediterranean Wetlands. *PLoS One* **10**, e0128112, doi:10.1371/journal.pone.0128112 (2015).
- 43 Mouchet, J., Gariou, J. & Rivola, E. Observations sur la biologie d'*Anopheles smithi* var. *rageau* Mattingly et Adam 1954, vecteur d'un plasmodium de mammifère aux environs de Yaoundé (Sud-Cameroun). *Bull Soc Pathol Exot* **50** (1957).
- 44 Diagne, N. *et al.* Les anopheles du Sénégal. *Bull Soc Pathol Exot* **87**, 267-277 (1994).
- 45 LaBeaud, A. D. *et al.* Arbovirus prevalence in mosquitoes, Kenya. *Emerg Infect Dis* **17**, 233-241, doi:10.3201/eid1702.091666 (2011).
- 46 Fontenille, D. *et al.* First isolations of arboviruses from phlebotomine sand flies in West Africa. *Am J Trop Med Hyg* **50**, 570-574 (1994).
- 47 Mellor, P. S., Boorman, J. & Baylis, M. Culicoides biting midges: Their role as arbovirus vectors. *Annual Review of Entomology* **45**, 307-340, doi:10.1146/annurev.ento.45.1.307 (2000).
- 48 Adam, J. P. Les Hémosporidies parasites d'animaux cavernicoles. *O.R.S.T.O.M. Fonds documentaires* (1974).
- 49 Rickenbach, A., Boreham, P. F. L., Weitz, B., Germain, M. & Eouzan, J. P. Etude des préférences trophiques des moustiques (Diptera, Culicidae) de la région de Yaoundé (Cameroun) par la méthode des tests de précipitines. *cah. O.R.S.T.O.M. sér. Ent. med et Parasitol.* **12**, 179-189 (1974).
- 50 Tantely, M. L., Le Goff, G., Boyer, S. & Fontenille, D. An updated checklist of mosquito species (Diptera: Culicidae) from Madagascar. *Parasite* **23**, 20, doi:10.1051/parasite/2016018 (2016).
- 51 Dossou-Yovo, J., Doannio, J. M. & Diarrassouba, S. [Feeding preferences of malaria vectors in the city of Bouake and in the surrounding villages



- of Cote d'Ivoire]. *Bull Soc Pathol Exot* **91**, 257-258 (1998).
- 52 Dia, I., Lochouarn, L., Boccolini, D., Costantini, C. & Fontenille, D. Spatial and temporal variations of the chromosomal inversion polymorphism of *Anopheles funestus* in Senegal. *Parasite* **7**, 179-184 (2000).
- 53 Hamon, J. & Adam, J. P. Observations sur la répartition et le comportement des anophèles de l'Afrique Equatoriale Française, du Cameroun et de l'Afrique Occidentale *Bull Wld Hlth Org* **15**, 549-594 (1956).
- 54 Lambert, D. M. A population gnetical study of the African mosquito *Anopheles marshallii* (Theobald). *Evolution* **37**, 484-495 (1983).
- 55 Haddow, A. J. & Ssenkubuge, Y. Studies on the biting habits of East African mosquitoes in the genera *Uranotaenia*, *Ficalbia* and *Hogdesia*. *Bull Ent Res* **53**, 639-652 (1963).
- 56 Service, M. W. The identification of blood meals from culicine mosquitoes from Nigeria. *Bull Ent Res* **55**, 637-643 (1965).
- 57 Abonnenc, E. & Clastrier, J. Phlébotomes de la République de Guinée. *Isr J Entomol* **9**, 55-76 (1974).
- 58 Dougall, A. M. *et al.* Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. *International journal for parasitology* **41**, 571-579, doi:10.1016/j.ijpara.2010.12.008 (2011).
- 59 Becker, E., Venter, G. J., Labuschagne, K., Greyling, T. & van Hamburg, H. The effect of anthropogenic activity on the occurrence of *Culicoides* species in the South-Western Khomas Region, Namibia. *Veterinaria italiana* **49**, 277-284, doi:10.12834/VetIt.1011.10 (2013).
- 60 Obame-Nkoghe, J. *et al.* Bat flies (Diptera: Nycteribiidae and Streblidae) infesting cave-dwelling bats in Gabon: diversity, dynamics and their potential role in the *Polychromophilus melanipherus* transmission. *Parasites & vectors* **9** (2016).
- 61 Abonnenc, E. Les Phlébotomes de la Région Ethiopienne. *Cah. ORSTOM. Ser. Entomol. Med. Parasitol* **55**, 289 PP (1972).
- 62 Oksanen, J. *et al.* vegan: Community Ecology Package. *R package version 2.0-10* (2013).
- 63 Shannon, C. E. The Mathematical Theory of Communication. *University of Illinois Press*. **117p** (1949).
- 64 Magurran, A. E. Ecological diversity and its measurement. *Princeton University Press, Princeton, NJ*. (1988).
- 65 Magurran, A. E. Measuring biological diversity. *John Willey & Sons* **264** (2003).
- 66 Bates, D., Maechler, M., Bolker, B. & Walker, S. lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4. *Journal of Statistical Software* (2015).

## Acknowledgments

We thank the *International Center for Medical Researches of Franceville (CIRMF)* for the technical support and for funding this work. We thank the Global Viral Forecasting Initiative-METABIOTA and the *Programme Pilote Régional-Forêts Tropicales Humides (PPR-FTH)* housed at the *Institut de Recherche pour le Développement (IRD)* for co-funding this work. All insect collections were authorized by the *Ministère de la Recherche Scientifique et du Développement Technologique du GABON* (authorizations N° AR0006/12/MENERSI/CENAREST/CG/CS T/CSAR and N° AR0011/13/MENERSI/CENAREST/CG/CS T/CSAR). We are also very grateful to the *Agence Nationale des Parcs Nationaux (ANPN)* and the *Centre National de la Recherche Scientifique et Technologique (CENAREST)* of Gabon that approved this study and facilitated access to the different sites. We thank Roger Kowe, André Delicat, Lilian-Brice Mangama Koumba and Boris Makanga for their technical assistance in the field and laboratory. We specially thank Daniel Couret from IRD for providing the estimated external rainfalls data, Karien Labuschagne from the Agricultural Research

Council-Onderstepoort Veterinary Institute (ARC-OVI) and Claire Garros from CIRAD for providing facilities and expertise in biting midge identification. We are grateful to the Pongui Canton Association (Lastoursville, Gabon) and we deeply thank the Ranch of LEKABI staff (Gabon) and its director Pascal Pommeret for his support and assistance in this study.

## Authors' contribution

ONJ, LEM and PC designed the research; ONJ, RN, BM, YP, MGD, JD, AX and PC performed the research; ONJ, AD, BN and PC analysed the data, and ONJ and PC wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

## Competing interest

We have no competing interests.

## Funding

This research was co-funded by the *Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF)*, the Global Viral Forecasting Initiative-METABIOTA and the *Programme Pilote Régional Forêts Tropicales Humides (PPR FTH)* housed at the *Institut de Recherche pour le Développement (IRD)*.

**Table 1:** Density and diversity of the Diptera assemblages in the different caves

	AD (sp/t/d)	S	Shannon index (H)	Estimated NS
<b><i>Culicidae</i></b>				
Kessipoughou	6.8	9	0.45	0.5
Djibilong	7.1	40	1.1	13.1
Faucon	39.5	3	0.1	0
Zadie	0.2	4	0.7	6
Siyou	4.2	8	0.8	1.5
Itsoulou	19.9	5	0.3	0
<b>Total**</b>	-	52	-	21.1
<b><i>Phlebotominae</i></b>				
Kessipoughou	1.3	6	0.09	1.5
Djibilong	4.8	7	0.6	0
Faucon	0	0	-	0
Zadie	0.5	5	0.6	8
Siyou	3	1	0	0
Itsoulou	4.2	1	0	0
<b>Total**</b>	-	11	-	4.5
<b><i>Ceratopogonidae</i></b>				
Kessipoughou	1.1	2	0.01	0
Djibilong	0.6	5	0.6	0
Faucon	0	0	-	0
Zadie	0	0	-	0
Siyou	0	0	-	0
Itsoulou	0	0	-	0
<b>Total**</b>	-	5	-	0
<b>All Diptera groups</b>				
Kessipoughou	9.2	17	0.7	5
Djibilong	12.5	52	1.3	15.1
Faucon	39.5	3	0.1	0
Zadie	0.7	9	0.9	21
Siyou	7.2	9	0.8	0.5
Itsoulou	24.1	6	0.5	0
<b>Total**</b>	-	68	-	41.6

-, not applicable" or not calculated data; \*\*, "Total" refers to the total number of collected species for the species richness (S), and to the sum of non-sampled (NS) species for the NS column in all caves; AD, apparent density (number of specimens collected per trap and per day; sp/t/d); H, diversity index.

**Table 2:** Composition of mosquito, sand fly and biting midge species assemblages in the Gabonese caves under study

Species	Number of specimens						Dominance index <i>d</i>					
	KESS	DJIB	FAUC	ZAD	SIY	ITSO	KESS	DJIB	FAUC	ZAD	SIY	ITSO
<i>Culicidae</i>												
<i>Ur. nigromaculata</i>	1114	126	62	0	11	28	0.7397	0.09	0.0654	0	<b>0.2156</b>	0.0877
<i>Ur. cavernicola</i> *†	189	0	1	1	8	12	<b>0.1254</b>	0	0.001	<b>0.25</b>	<b>0.1568</b>	0.0376
<i>An. smithii</i> s.l.**†	110	0	0	0	19	272	0.0730	0	0	0	<b>0.3625</b>	<b>0.8526</b>
<i>Cx. rima</i> group	65	244	886	0	6	6	0.0431	<b>0.155</b>	<b>0.9336</b>	0	<b>0.11</b>	0.019
<i>An. faini</i> *†	13	2	0	0	0	0	0.0086	0.001	0	0	0	0
<i>Ur. nigripes</i> *	11	0	0	0	0	0	0.0074	0	0	0	0	0
<i>An. funestus</i>	2	0	0	0	0	0	0.0014	0	0	0	0	0
<i>Cx. nebulosus</i>	1	0	0	0	0	0	0.0007	0	0	0	0	0
<i>Cx. umbripes</i> *	1	0	0	0	0	0	0.0007	0	0	0	0	0
<i>Cx. quasiquarti</i> *	0	590	0	0	3	0	0	<b>0.376</b>	0	0	0.0571	0
<i>Fi. uniformis</i> *	0	136	0	0	0	0	0	0.086	0	0	0	0
<i>Ur. caliginosa</i> *	0	102	0	0	0	0	0	0.065	0	0	0	0
<i>Ur. caeruleocephala</i> *	0	76	0	0	0	0	0	0.048	0	0	0	0
<i>Ur. machadoi</i> *	0	75	0	0	0	0	0	0.047	0	0	0	0
<i>Ur. bilineata</i> *	0	65	0	0	0	0	0	0.041	0	0	0	0
<i>Cx. trifilatus</i>	0	56	0	0	0	0	0	0.035	0	0	0	0
<i>Lu. tigripes</i>	0	27	0	0	0	0	0	0.017	0	0	0	0
<i>Cx. watti</i> *	0	7	0	0	0	0	0	0.004	0	0	0	0
<i>An. theileri</i> *	0	7	0	0	0	0	0	0.004	0	0	0	0
<i>Ur. pallidocephala</i>	0	6	0	0	0	0	0	0.004	0	0	0	0
<i>An. marshallii</i>	0	4	0	0	0	0	0	0.002	0	0	0	0
<i>Ur. balfouri</i>	0	4	0	0	0	0	0	0.002	0	0	0	0
<i>Ur. chorleyi</i> *	0	3	0	0	0	0	0	0.002	0	0	0	0
<i>Co. pseudoconopas</i> *	0	3	0	0	0	0	0	0.002	0	0	0	0
<i>Cx. andersoni</i> *	0	3	0	0	0	0	0	0.002	0	0	0	0
<i>Mi. plumosa</i>	0	3	0	0	0	0	0	0.002	0	0	0	0
<i>Co. aurites</i>	0	2	0	0	0	0	0	0.001	0	0	0	0
<i>Culex</i> sp	0	2	0	1	0	0	0	0.001	0	<b>0.25</b>	0	0
<i>An. jebudensis</i> *	0	2	0	0	0	0	0	0.001	0	0	0	0
<i>An. obscurus</i>	0	2	0	0	0	0	0	0.001	0	0	0	0
<i>Cx. zombaensis</i> *	0	2	0	0	0	0	0	0.001	0	0	0	0
<i>Er. grahami</i> *	0	2	0	0	0	0	0	0.001	0	0	0	0
<i>Ca. argenteopunctata</i>	0	2	0	0	1	0	0	0.001	0	0	0.0196	0
<i>Cx. cinerellus</i> *	0	1	0	0	0	0	0	0.0006	0	0	0	0
<i>Finlaya</i> sp. *	0	1	0	0	0	0	0	0.0006	0	0	0	0
<i>An. nili</i>	0	1	0	0	0	0	0	0.0006	0	0	0	0
<i>Co. versicolor</i> *	0	1	0	0	0	0	0	0.0006	0	0	0	0
<i>Cx. semibrunneus</i> *	0	1	0	0	0	0	0	0.0006	0	0	0	0
<i>Cx. annulioris</i>	0	1	0	0	0	0	0	0.0006	0	0	0	0
<i>Co. microannulata</i> *	0	1	0	0	0	0	0	0.0006	0	0	0	0
<i>An. natalensis</i> *	0	1	0	0	0	0	0	0.0006	0	0	0	0
<i>Cx. simpsoni</i> *	0	1	0	0	0	0	0	0.0006	0	0	0	0
<i>Er. chrysogaster</i>	0	1	0	0	0	0	0	0.0006	0	0	0	0
<i>An. schwetzi</i> *	0	1	0	0	0	0	0	0.0006	0	0	0	0

Partie 2 : Mémoire expérimental | Exploration de la diversité des diptères hématophages libres des grottes du Gabon

<i>Ur. alboabdominalis</i> *	0	1	0	0	0	0	0	0.0006	0	0	0	0
<i>Ps. kummi</i> *	0	1	0	0	0	0	0	0.0006	0	0	0	0
<i>Cx. cinereus</i> *	0	1	0	0	0	0	0	0.0006	0	0	0	0
<i>Aedes</i> sp.	0	0	0	1	0	0	0	0	0	<b>0.25</b>	0	0
<i>Anopheles</i> sp	0	0	0	1	0	0	0	0	0	<b>0.25</b>	0	0
<i>Cx. rubinotus</i>	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0.0392	0
<i>Ur. mashonaensis</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0.0196	0
<i>Ae. simulans</i> *	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.0196	0.0031
<b>Phlebotominae</b>												
<i>Sl. gigas</i> **†	268	428	0	6	37	68	<b>0.9675</b>	<b>0.4056</b>	0	<b>0.5</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<i>Sa. emilii</i> †	4	352	0	1	0	0	0.0145	<b>0.3336</b>	0	0.0834	0	0
<i>Se. bedfordi</i> group *	2	12	0	0	0	0	0.0072	0.0114	0	0	0	0
<i>Ph. rodhaini</i> *	1	214	0	0	0	0	0.0036	<b>0.2029</b>	0	0	0	0
<i>Se. ingrami</i> *	1	46	0	0	0	0	0.0036	0.0437	0	0	0	0
<i>Se. dubia</i> *	1	0	0	0	0	0	0.0036	0	0	0	0	0
<i>Se. congolensis</i> *	0	0	0	3	0	0	0	0	0	<b>0.25</b>	0	0
<i>Se. africana</i> *	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0.0833	0	0
<i>Se. magna</i> *	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0.0833	0	0
<i>Sa. moucheti</i> †	0	1	0	0	0	0	0	0.0009	0	0	0	0
<i>Se. balmicola</i>	0	2	0	0	0	0	0	0.0019	0	0	0	0
<b>Ceratopogonidae</b>												
<i>C. trifasciellus</i> group *	240	17	0	0	0	0	<b>0.9917</b>	<b>0.1405</b>	0	0	0	0
<i>Forcipomyia</i> sp *	2	30	0	0	0	0	0.0083	<b>0.2479</b>	0	0	0	0
<i>C. fulvithorax</i> *	0	65	0	0	0	0	0	<b>0.5372</b>	0	0	0	0
<i>C. milnei</i> group *	0	8	0	0	0	0	0	0.0662	0	0	0	0
<i>C. distinctipennis</i> *	0	1	0	0	0	0	0	0.0082	0	0	0	0

**KESS:** Kessipoughou, **DJIB:** Djibilong, **FAUC:** Faucon, **ZAD:** Zadie, **SIY:** Siyou, **ITSO:** Itsoulou.

**Ur:** *Uranotaenia*, **An:** *Anopheles*, **Cx:** *Culex*, **Fi:** *Ficalbia*, **Lu:** *Lutzia*, **Co:** *Coquillettidia*, **Mi:** *Mimomyia*, **Er:** *Eretmapodites*.

**Ca:** *Catageomyia*, **Ps:** *Pseudoarmigeres*, **Ae:** *Aedes*. **Sl:** *Spelaeophlebotomus*, **Sa:** *Spelaeomyia*, **Se:** *Sergentomyia*,

**Ph:** *Phlebotomus*, **C:** *Culicoides*.

\*, new records for Gabon; \*\*, species previously recorded in Gabonese caves; †, species previously known as "true cavernicolous". The index *d* value of dominant species is marked in bold.

**Table S1: Comparison of the similarity index  $C$  values for each Diptera group between caves**

	Culicidae					Phlebotominae				
	Djibilong	Kessipoughou	Faucon	Zadie	Siyou	Djibilong	Kessipoughou	Faucon	Zadie	Siyou
Kessipoughou	0.17					Kessipoughou	0.63			
Faucon	0.28	0.12				Faucon	Na	Na		
Zadie	<0.01	0.11	<0.01			Zadie	0.78	0.80	Na	
Siyou	0.28	0.53	0.22	0.46		Siyou	0.61	0.99	Na	0.78
Itsoulou	0.02	0.20	0.03	0.02	0.72	Itsoulou	0.61	0.99	Na	0.78 1

**Na**, couples in which mosquitoes or sand flies were not collected in at least one of the two caves.

Biting midges were only collected in Kessipoughou and Djibilong and the similarity index was 0.16.

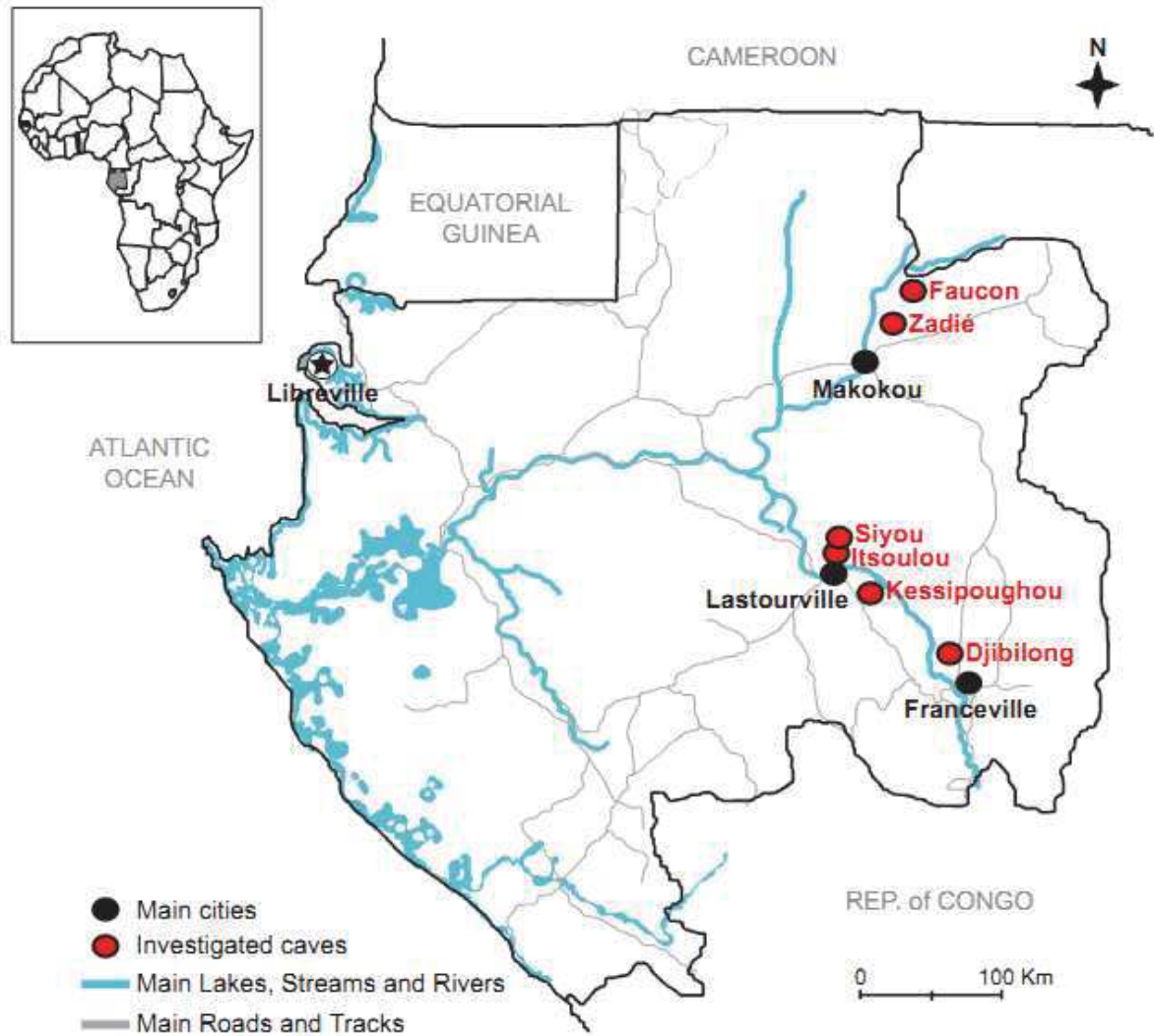
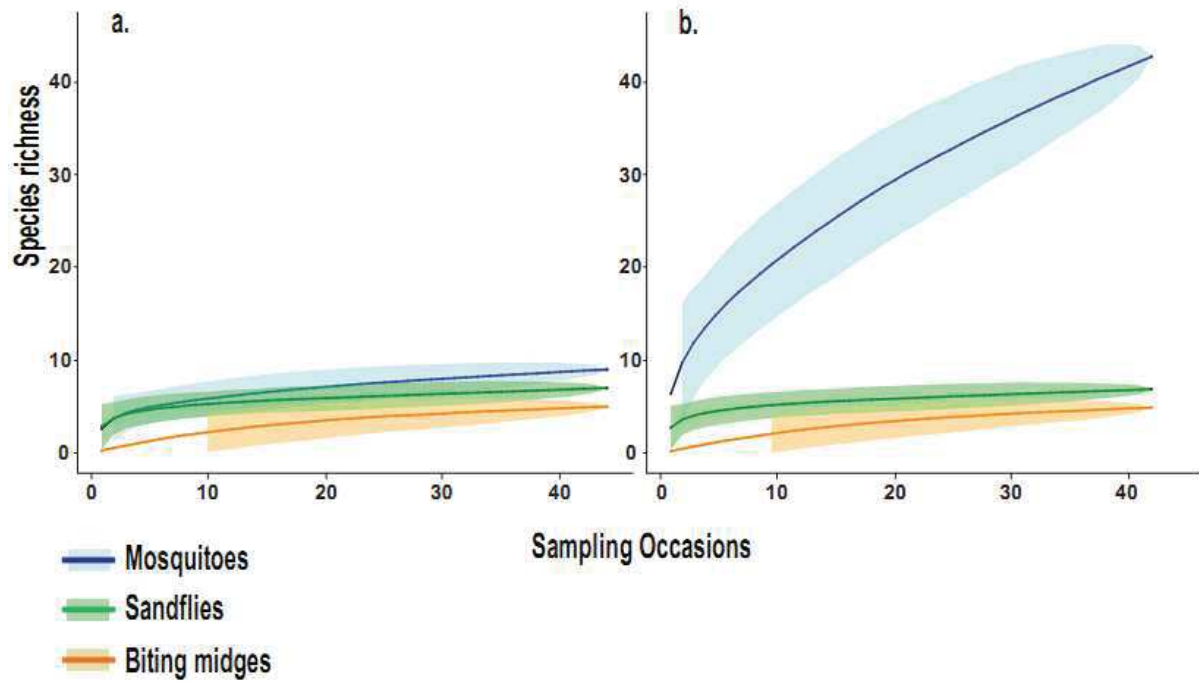
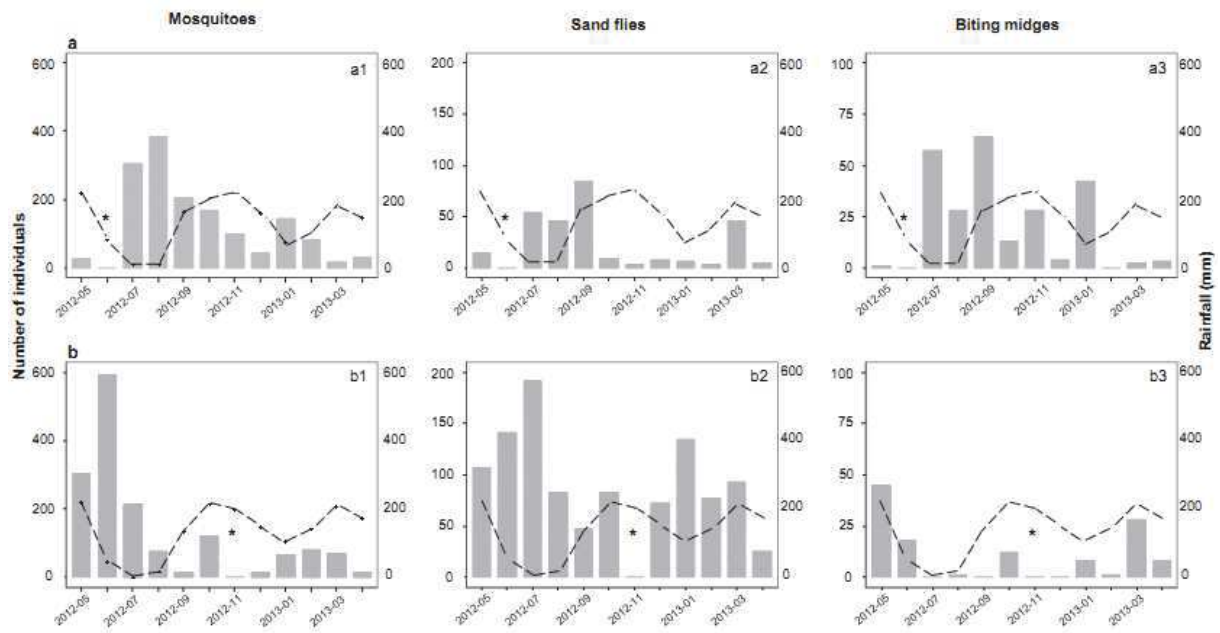


Fig. 1. Geographic location of the six investigated caves.

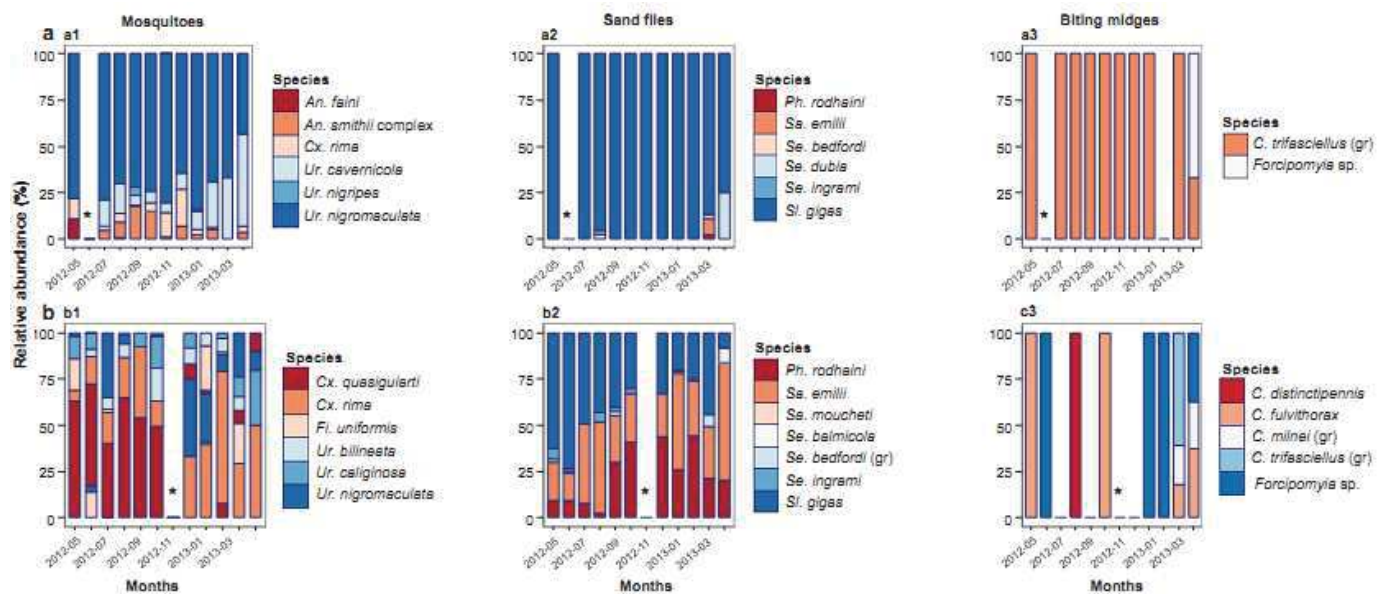




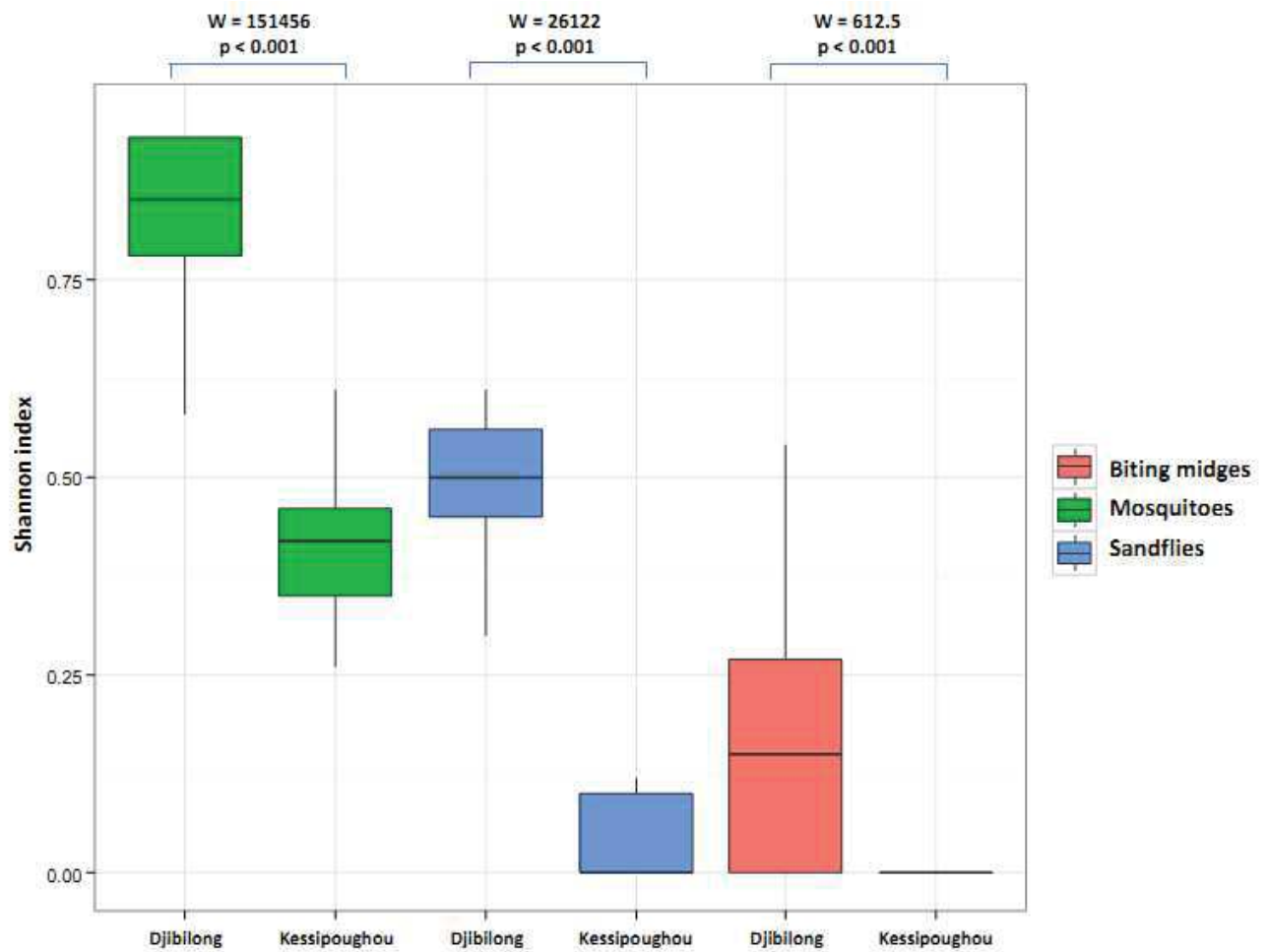
**Fig. 2.** Species accumulation curves for mosquitoes, sand flies and biting midges relative to the number of sampling events in Kessipoughou (A) and Djibilong (B) caves. Curves show the cumulated species richness (S values) of Diptera groups according to sampling events. Sampling representativeness seemed good for each insect group in both caves, with the exception of mosquitoes in Djibilong. The lack of representativeness for the mosquito community inside Djibilong cave was confirmed by the important number of estimated non-sampled species ( $NS = 13.1$ , Table 1), extrapolated from the Chao index.



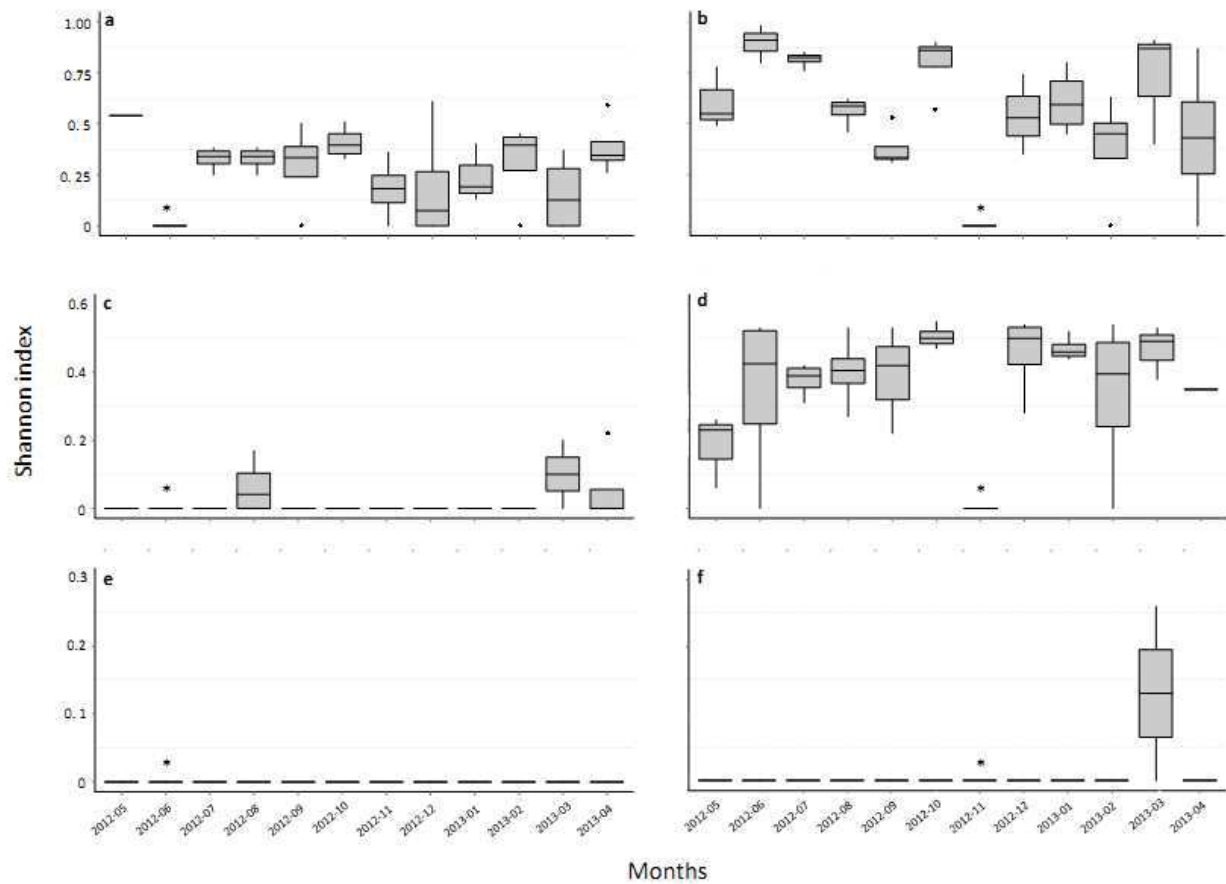
**Fig. 3. Density variations for each Diptera group along time in Kessipoughou (A) and Djibilong (B) caves.** Histograms (in grey) show the number of individuals for each Diptera group (mosquitoes, sand flies and biting midges) collected each month from May 2012 to April 2013. The monthly rainfall estimates (in mm, broken line) were from the United States Department of Commerce, National Weather Service/Climate Prediction Center (<http://www.cpc.ncep.noaa.gov/products/fews/africa>). \*, month without sampling.



**Fig. 4. Temporal variations in species dominance in Kessipoughou (A) and Djibilong (B) caves.** For mosquitoes, only the six most dominant species in assemblages were taken into account (most of the other species represented less than 0.2% in density/each). For all Diptera, species with the highest relative abundance at a given time point were considered as dominant. Above bars is the number of individuals per each month collected. \*, month without sampling. gr., group.



**Fig. S1.** Comparison of the mean Shannon diversity index  $H$  for Culicidae (mosquitoes), Phlebotominae (sandflies) and Ceratopogonidae (biting midges) in Kessipoughou and Djibilong caves. The Shapiro-Wilk test of normality ( $\alpha$  level of 0.05) showed that the data for 11 months of observation were non-normally distributed (all p-value were  $<0.05$ ). Therefore, the mean diversity index  $H$  values for the three groups for the entire sampling period were then compared between caves using the non-parametric alternative Wilcoxon test with an  $\alpha$  level of 0.05. "W" indicates the Wilcoxon comparison test value.



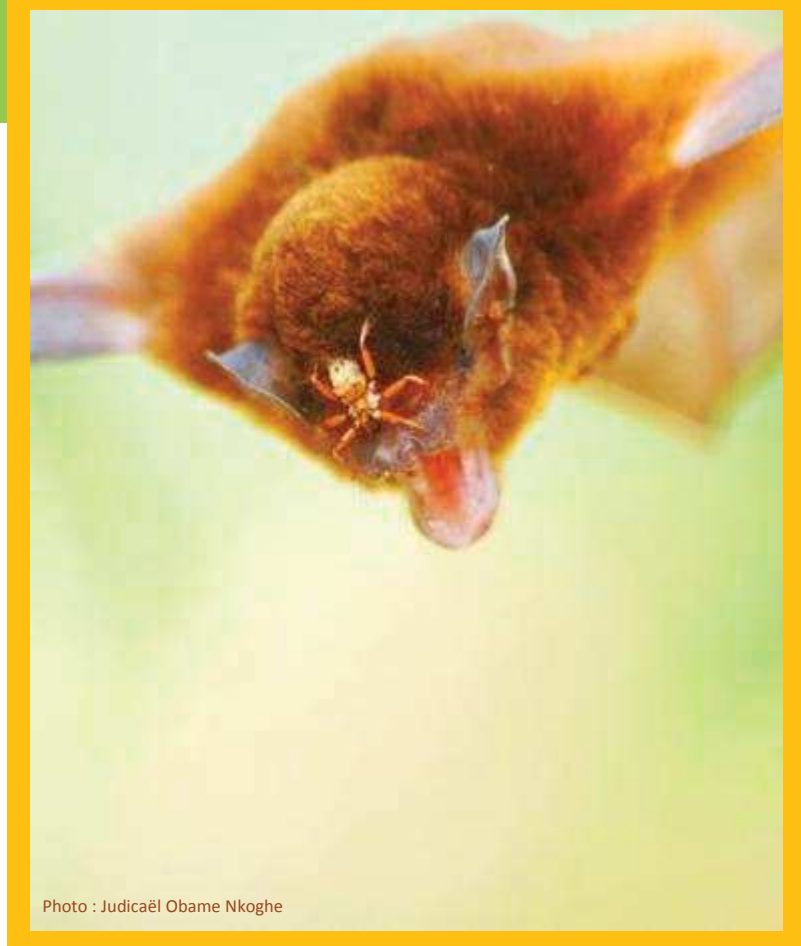
**Fig. S2.** Variations of the mean values of the Shannon diversity index  $H$  for mosquitoes (A: Kessipoughou, B: Djibilong), sand flies (C: Kessipoughou, D: Djibilong) and biting midges (E: Kessipoughou, F: Djibilong) along time. The Shapiro-Wilk test ( $\alpha$  level of 0.05) for all data had a p-value  $>0.05$ , indicating that data were normally distributed. Therefore, the mean values of the Shannon index  $H$  were compared at different time points (11 months of sampling, from May 2012 to April 2013) using one-way analysis of variance (ANOVA) with an  $\alpha$  level of 0.05. The ANOVA revealed a significant variation of the mean diversity only for mosquitoes in Djibilong (panel b: F-value = 2.9; Df = 10; p-value = 0.01). The variation of the other mean  $H$  values (Diptera group and cave) was non-significant (panel a: F-value = 1.17, Df = 10, p-value = 0.34; panel c: F-value = 1.04, Df = 10, p-value = 0.44; panel d: F-value = 1.49, Df = 10, p-value = 0.18; panel e: not applicable; panel f: F-value = 0.14, Df = 10, p-value = 0.9;); \* indicates a month without sampling.



## Chapitre 6

# Diversité des diptères hématophages ectoparasites de chauves-souris cavernicoles du Gabon et implication dans la transmission d'hémosporidies

Ce chapitre présente, à travers un résumé détaillé, la diversité des espèces d'ectoparasites parasitant les chauves-souris cavernicoles du Gabon. Un regard particulier est porté sur les interactions entre les population d'ectoparasites et leurs hôtes, et leur implication dans la transmission d'hémosporidies. Ce chapitre fait l'objet d'un article (N°3), intitulé " Bat flies (Diptera: Nycteribiidae and Streblidae) infesting cave-dwelling bats in Gabon: Diversity, dynamics and potential role in *Polychromophilus melanipherus* transmission", publié en 2016 dans la revue *Parasites and Vectors*.



## 6.1. Contexte

Les chauves-souris figurent parmi les plus importants réservoirs animaux d'agents pathogènes à l'origine de problèmes majeurs de santé publique à l'échelle globale (Calisher et al., 2006; Kohl and Kurth, 2014; Shi, 2013). En Afrique les milieux cavernicoles hébergent un important nombre d'espèces qui peuvent former des colonies de plusieurs milliers d'individus vivant dans une promiscuité favorable à la transmission d'agents infectieux. La découverte et la description de nombreux hémosporidies infectant les chauves-souris cavernicoles (Adam and Landau, 1973a-b; Ayala et al., 1981; Landau and Adam, 1973; Landau et al., 2012) continue de susciter un intérêt quant à leurs modalités de transmission. Le rôle vecteur de divers arthropodes hématophages cavernicoles a fait l'objet de quelques investigations, mais avec à chaque fois un intérêt particulier porté à des diptères libres (moustiques, phlébotomes) plutôt qu'à des ectoparasites hématophages.. De récentes investigations ont cependant montré le rôle des ectoparasites de chauves-souris dans la transmission d'hémosporidies (Megali et al., 2011), confortant ainsi les premières suspicions quant au rôle des ces diptères dans la transmission de *Polychromophilus* en Afrique (Adam and Landau, 1973b). Au Gabon (Afrique Centrale), les parasites du genre *Polychromophilus* circulent chez les populations de chauves-souris cavernicoles (Duval et al., 2012). Il restait encore à découvrir l'identité de leurs vecteurs potentiels parmi les ectoparasites de chauves-souris. Nous avons donc entrepris notre étude avec cet objectif, mais aussi avec celui d'explorer la diversité et la dynamique des espèces constitutives des communautés d'ectoparasites de chauves-souris cavernicoles, la spécificité des associations entre les ectoparasites et les chauves-souris.



## 6.2. Procédure expérimentale

Nous avons collecté des diptères ectoparasites de chauves-souris (Nycteribiidae et Streblidae) dans quatre grottes du Gabon (les grottes du Faucon, de Zadié, de Kessipoughou et de Djibilong). Ils ont été collectés sur des chauves-souris capturées à l'aide d'un piège harpe. Dans les grottes du Faucon et de Zadié la collecte de chauves-souris s'est déroulée sur deux nuits consécutives durant chaque mois entre Février 2011 et Avril 2011. Dans les grottes de Kessipoughou et Djibilong, les chauves-souris ont été collectées sur quatre nuits consécutives durant onze mois entre Mai 2012 et Avril 2013. Toutes les chauves-souris ont été inspectées pour la recherche et le prélèvement des ectoparasites qui ont été regroupés en lots mono-spécifiques, chacun correspondant à un unique individu de chauve-souris. Dans un premier temps nous avons analysé les interactions « hôte-parasite », en nous focalisant particulièrement sur la préférence d'hôte des espèces d'ectoparasites vis-à-vis des espèces de chauves-souris. Dans un second temps nous avons procédé au criblage moléculaire d'hémosporidies (amplification et séquençage d'un fragment du gène *cytochrome b*) puis déterminé les taux d'infection des espèces d'ectoparasites.

## 6.3. Résultats

Nous avons capturé 1154 chauves-souris réparties en cinq espèces ou complexe d'espèces, à savoir : *Miniopterus inflatus* (n = 354), *Hipposideros gigas* (n = 317), le complexe *Hipposideros caffer* (n = 285), *Rousettus aegyptiacus* (n = 157) et *Coleura afra* (n = 41). Sur l'ensemble des chauves-souris collectées, 439 (38%) étaient infestées par au moins un ectoparasite . Au total ce sont 1063 ectoparasites répartis en cinq espèces ou groupes d'espèces qui ont pu être collectés. Ainsi pour la famille des Nycteribiidae (représentant un total de 83,4% de l'ensemble des ectoparasites) *Nycteribia schmidlii scotti* (73,3%), *Eucampsipoda africana* (18,7%), *Penicillidia*

*fulvida* (8%) ont été retrouvées. Pour la famille des Streblidae (représentant un total de 16,6% de l'ensemble des ectoparasites) deux espèces ont été collectées : *Brachytarsina allaudi* (35,3%) et une espèce du groupe *Raymondia huberi* (64,7%).

Nous avons observé, en considérant les grottes ensemble ou séparément, une variation significative du nombre moyen d'ectoparasites en fonction des espèces de chauves-souris (*ANOVA*,  $F=88.28$ ,  $p\text{-value} < 0.001$ ), les individus appartenant aux espèces *M. inflatus* (74,21%) et *R. aegyptiacus* (66,52%) s'avérant être les plus fortement parasités. Cependant l'intensité de l'infestation d'ectoparasites par individu pour une espèce de chauves-souris donnée reste similaire quelque soit la grotte. Nos analyses ont montré des tendances d'associations préférentielles significatives entre certaines espèces d'ectoparasites et de chauves-souris. Les espèces *N. schmidlii scotti* et *P. fulvida* parasitent préférentiellement la chauve-souris *M. inflatus*. De façon similaire *E. africana*, le groupe *R. huberi* et *B. allaudi* parasitent préférentiellement *R. aegyptiacus*, le complexe *H. caffer* et *H. gigas* respectivement. Malgré ces associations préférentielles, nous avons noté quelques cas d'associations « non préférentielles », qui peuvent être dues à d'éventuels transferts accidentels ou l'usage des hôtes « non préférentiels » comme de véritables hôtes secondaires.

Nous avons analysé les interactions entre les ectoparasites et les chauves-souris dans le temps dans les grottes de Kessipoughou et Djibilong. Les analyses ont révélé une variation significative du taux d'infestation au cours du temps pour toutes les espèces de chauves-souris. Cependant, bien que le taux d'infestation des chauves-souris ait présenté des variations au cours du temps, le nombre moyen d'ectoparasites par chauve-souris n'a pas présenté de variation significative au cours du temps, quelque soit l'espèce d'ectoparasite, la grotte, ou encore l'espèce de chauve-souris.

Pour rechercher des infections par des hémosporidies chez les ectoparasites, nous avons analysé un total de 416 lots mono-spécifiques d'ectoparasites issus de toutes les

grottes (Faucon : 37 ; Zadié : 11 ; Kessipoughou : 221 ; et Djibilong : 147). Nous avons ainsi pu détecter la présence d'hémosporidies dans 75 lots (18,02%), dont 5 provenant de chauves-souris collectées dans la grotte du Faucon (13,51%), 27 dans la grotte de Kessipoughou (12, 21%) et 43 dans la grotte de Djibilong (29,25%). Après le séquençage des produits d'amplification et les analyses phylogénétiques, la totalité des parasites détectés a été assignée à *Polychromophilus melanipherus*. L'analyse des taux d'infection a montré que *N. schmidlii scotti* (MLE-IR = 12%) et *P. fulvida* (MLE-IR = 11,3%) étaient les espèces les plus infectées. Les ectoparasites issus des lots infectés ont été collectés en majorité (n = 71) sur l'espèce *M. inflatus* (63 lots constitués de l'espèce *N. schmidlii scotti* et 8 lots de l'espèce *P. fulvida*). Sur l'ensemble des ectoparasites, que ce soit à Kessipoughou ou à Djibilong, l'espèce *N. schmidlii scotti* a été retrouvée infectée au cours de la majeure partie de l'année, alors que les infections chez *P. fulvida* n'ont été détectées que de façon intermittente. L'analyse des différentes séquences de *P. melanipherus* détectées nous ont permis de mettre en évidence 8 haplotypes parmi lesquels trois se sont avérés dominants dans les grottes de Kessipoughou et Djibilong.

#### 6.4. Conclusions

En dehors d'une unique espèce d'ectoparasite de chauves-souris signalée il y'a près de quarante années (Landau et al., 1980a), cette étude nous a permis d'identifier deux nouvelles espèces de Nycteribiidae (*N. schmidlii scotti* et *E. africana*) et trois nouvelles espèces de Streblidae (*B. allaudi* et deux espèces du groupe *R. huberi*) pour le Gabon, portant ainsi le nombre d'espèces connues à six.

C'est la première fois que l'espèce de Nycteribiidae *E. africana* et l'ensemble des espèces de Streblidae identifiées dans cette étude sont rapportées en Afrique Centrale. Cependant *E. africana* est bien connue dans le reste de la Région Ethiopienne où elle parasite les chauves-souris du genre *Rousettus* et *Eidolon* (*E. africana*) (Theodor,

1967). En revanche les trois espèces de Streblidae n'étaient connues qu'en Afrique de l'Est où elles parasitent des chauves-souris des genres *Hipposideros*, *Cardioderma* ou *Triaenops* (groupe *R. huberi*) et *Epomophorus* (*B. allaudi*) (Theodor, 1968).

Dans l'ensemble des grottes, nous avons observé une forte tendance à des associations préférentielles entre les espèces d'ectoparasites et les différentes chauves-souris hôtes. Cependant des investigations plus approfondies, notamment sur l'origine des repas de sang, pourrait aider à confirmer l'existence de possibilité d'infestations accidentelles des chauves-souris par des ectoparasites. Nos résultats ont montré, bien que le nombre moyen d'ectoparasites infestant les chauves-souris demeurait stable au cours du temps, que le taux d'infestation des chauves-souris variaient significativement dans le temps. Cela suggère que le taux d'infestation (le degré de diffusion des ectoparasites dans une communauté de chauves-souris) est un meilleur paramètre pour évaluer ce parasitisme.

Nos résultats ont permis de révéler la présence de l'hémosporidie *P. melaniphrus* chez les Nycteribiidae *N. schmidlii scotti* et *P. fulvida*. Les taux d'infection élevés de ces deux espèces suggère leur implication dans le processus de transmission de ce parasite aux chauves-souris, comme cela à précédemment été démontré en Afrique Centrale pour *P. fulvida* (Adam and Landau, 1973b). Nos résultats ont montré que le niveau d'infection des ectoparasites de chauves-souris différait peu entre les grottes, suggérant une intensité de la transmission similaire dans les différentes grottes. Cependant la variation du taux d'infection à *P. melaniphrus* au cours du temps semble refléter celle du taux d'infestation des chauves-souris.

RESEARCH

Open Access



# Bat flies (Diptera: Nycteribiidae and Streblidae) infesting cave-dwelling bats in Gabon: diversity, dynamics and potential role in *Polychromophilus melanipherus* transmission

Judicaël Obame-Nkoghe<sup>1,2</sup>, Nil Rahola<sup>1,2</sup>, Mathieu Bourgarel<sup>2,3</sup>, Patrick Yangari<sup>2</sup>, Franck Prugnolle<sup>1,2</sup>, Gael Darren Maganga<sup>2</sup>, Eric-Maurice Leroy<sup>1,2</sup>, Didier Fontenille<sup>1,4</sup>, Diego Ayala<sup>1,2</sup> and Christophe Paupy<sup>1,2\*</sup>

## Abstract

**Background:** Evidence of haemosporidian infections in bats and bat flies has motivated a growing interest in characterizing their transmission cycles. In Gabon (Central Africa), many caves house massive colonies of bats that are known hosts of *Polychromophilus Dionisi* parasites, presumably transmitted by blood-sucking bat flies. However, the role of bat flies in bat malaria transmission remains under-documented.

**Methods:** An entomological survey was carried out in four caves in Gabon to investigate bat fly diversity, infestation rates and host preferences and to determine their role in *Polychromophilus* parasite transmission. Bat flies were sampled for 2–4 consecutive nights each month from February to April 2011 (Faucon and Zadie caves) and from May 2012 to April 2013 (Kessipoughou and Djibilong caves). Bat flies isolated from the fur of each captured bat were morphologically identified and screened for infection by haemosporidian parasites using primers targeting the mitochondrial cytochrome b gene.

**Results:** Among the 1,154 bats captured and identified as *Miniopterus inflatus* Thomas (n = 354), *Hipposideros caffer* Sundevall complex (n = 285), *Hipposideros gigas* Wagner (n = 317), *Rousettus aegyptiacus* Geoffroy (n = 157, and *Coleura afra* Peters (n = 41), 439 (38.0 %) were infested by bat flies. The 1,063 bat flies recovered from bats belonged to five taxa: *Nycteribia schmidlii* scotti Falcoz, *Eucampsipoda africana* Theodor, *Penicillidia fulvida* Bigot, *Brachytarsina allaudi* Falcoz and *Raymondia huberi* Frauenfeld group. The mean infestation rate varied significantly according to the bat species (ANOVA,  $F_{(4,75)} = 13.15$ ,  $P < 0.001$ ) and a strong association effect between bat fly species and host bat species was observed. *Polychromophilus melanipherus* *Dionisi* was mainly detected in *N. s. scotti* and *P. fulvida* and less frequently in *E. africana*, *R. huberi* group and *B. allaudi* bat flies. These results suggest that *N. s. scotti* and *P. fulvida* could potentially be involved in *P. melanipherus* transmission among cave-dwelling bats. Sequence analysis revealed eight haplotypes of *P. melanipherus*.

(Continued on next page)

\* Correspondence: christophe.paupy@ird.fr

<sup>1</sup>Laboratoire MIVEGEC, UMR 224–5290 CNRS-IRD-UM, IRD Montpellier, Montpellier, France

<sup>2</sup>Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF), Franceville, Gabon

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



© 2016 The Author(s). Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

(Continued from previous page)

**Conclusions:** This work represents the first documented record of the cave-dwelling bat fly fauna in Gabon and significantly contributes to our understanding of bat fly host-feeding behavior and their respective roles in *Polychromophilus* transmission.

**Keywords:** Bat fly, Ectoparasites, Bats, mtDNA, Cytochrome b, *Polychromophilus*, Caves, Gabon, Central Africa

## Background

Bats are among the most important reservoirs of pathogens that are major public health concerns worldwide [1–3]. The African continent hosts more than one third of all bat species (13 families, 70 genera and more than 340 species) [4]. Some species colonize cave environments, forming very large colonies that include up to several thousands of individuals, with a high degree of promiscuity that favors pathogen transmission. Besides viruses, bats are the hosts of several haemosporidian parasites [5–8], including parasites from the genera *Plasmodium* Marchiafava & Celli, 1885 [6, 9, 10], *Hepatocystis* Levaditi & Schoen, 1932 [11] and *Nycteria* Garnham & Heisch, 1953 [12], which mostly infect Yinpterochiroptera [13–15] and Yangochiroptera bats, including Miniopteridae. Earlier descriptions of haemosporidian parasites infecting cave-dwelling bats [13, 14, 16, 17] have raised a growing interest on their transmission cycles and their potential arthropod vectors. The vector role of several blood-sucking arthropod groups living in caves has been investigated, with particular emphasis on mosquitoes [5, 18–20], biting midges [21] and sand flies [22–25]. Conversely, only few studies have been devoted to bat flies (Diptera: Brachycera), despite their role in transmission of infectious agents [26] favored by their ectoparasitic lifestyle, and particularly their circumstantial incrimination in bat haemosporidian parasite infections [15, 27].

Bat flies infest exclusively bats and, like all members of the superfamily Hippoboscoidea, reproduce via viviparous puparity [28]. They belong to two families: Streblidae and Nycteribiidae. Streblidae bat flies have functional wings, while Nycteribiidae flies have a spider-like appearance and are wingless, as an extreme adaptation to ectoparasitism. Male and female bat flies are strictly haematophagous [29] and feed regularly on their hosts. Bat flies spend most of their lifetime on bats, nested in the fur and wings, and die within two days when they are separated from their host [30]. Females regularly leave their host to deposit prepupae, after which they colonize another host individual [29]. Generally, bat flies are monoxenous (i.e. they parasitize a single bat species) [31, 32]; however, they may infest more than one host species (oligoxenous, or polyxenous) [33, 34], depending on the host availability and behavior.

To date, nearly 40 species (or sub-species) of Nycteribiid and 32 of Streblid bat flies have been documented in Africa [30, 34, 35], mostly in the Democratic Republic of

Congo (Central Africa) and South Africa. Some additional records are from Cameroon, Nigeria and East Africa (Kenya, Sudan, Tanzania and Uganda) [30, 34]. However, knowledge on bat flies that parasitize cave-dwelling chiropterans is very scarce, especially in Central Africa.

Recent investigations demonstrated the role of bat flies in the transmission of haemosporidian parasites [36], mirroring the earlier discovery that *Penicillidia fulvida*, an African bat fly species, was involved in *Polychromophilus* transmission in Congo-Brazzaville [15]. Moreover, the Palearctic species *Nycteribia kolenatii* Theodor & Mosconahas is considered to be a vector of *Polychromophilus murinus* Dionisi in cave environments [36, 37]. In Gabon, recent studies on “malaria” parasites infecting cave-dwelling bats revealed that greater long-fingered bats (*Miniopterus inflatus*) are infected by *Polychromophilus melanipherus* [38].

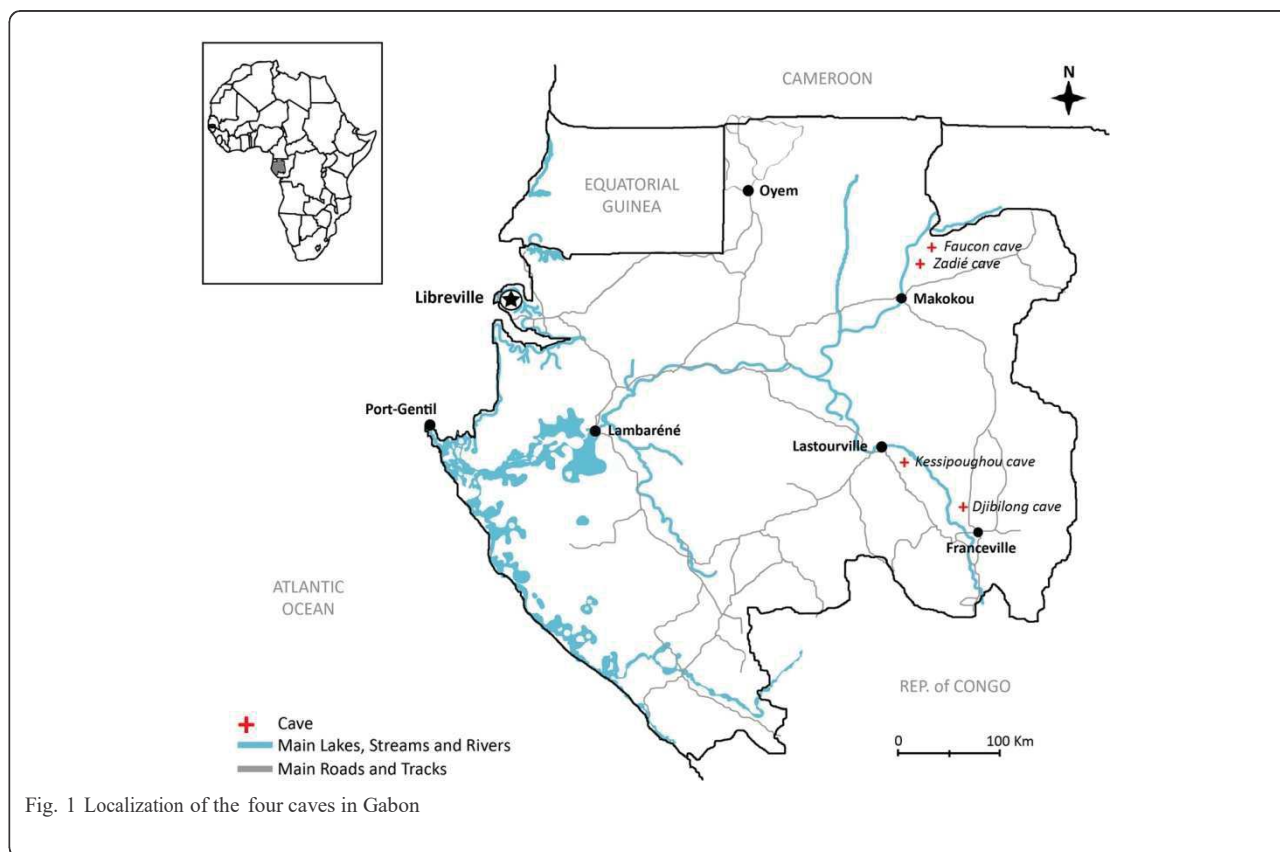
Due to their vector potential, it is therefore crucial to better investigate bat fly diversity, spatial distribution and relationship with their host bat species and to elucidate their vector capacity. To this aim, a longitudinal entomological survey was undertaken to assess the diversity, host preference and implication in parasite transmission of bat flies that infect bats in four caves in Gabon (Central Africa).

## Methods

### *Study sites, bat and ectoparasite sampling*

Entomological surveys were performed in four caves in Gabon (Fig. 1). The Faucon cave (01.07287N, 13.20739E) and Zadié cave (00.98595N, 13.19745E) are located in the Belinga rainforest (North-East of Gabon) (Fig. 1). The Faucon cave is extremely humid (almost 100 % relative humidity) and has a 4 m high and 6 m wide entrance that leads directly to the main chamber (35 m long, 30 m wide and 10 m high). The main chamber ends in cavities and tunnels that are difficult to access and has a chimney of 1 m in diameter. The Zadié cave is much drier than the Faucon cave and has a large entrance (10 m long by 5 m high) that brings to a funnel-shaped corridor. The corridor leads to the main chamber (900 m<sup>2</sup> and 5–10 m high). The deeper part of the chamber continues into a secondary, smaller chamber of about 300 m<sup>2</sup>. The Kessipoughou cave (00.86722S, 12.77389E) is located in a forested area near Lastoursville town, and is one of the largest known caves in





Gabon. The Kessipoughou cave forms a long tunnel (15–20 m high and variable width reaching about 25–30 m at some places) through which a river runs. There are two entrances shaped by water infiltration and several chambers and galleries. The Djibilong cave (01.36261S, 13.46296E) is located in a mixed savanna-forest area in the South-East of Gabon, near the city of Franceville. The oblique entrance of this cave is about 3 m wide and leads to a large main chamber (40 m wide and 10 m high). At its extremity, the main chamber bifurcates into two secondary chambers with large stagnant ponds created by water infiltration.

Bats were captured monthly from February to April 2011 (Faucon and Zadié caves) and from May 2012 to April 2013 (Kessipoughou and Djibilong caves) using a harp trap (G7 Cave Catcher Harp Trap designed and manufactured by ©Bat Conservation and Management, Inc.) in accordance with the guidelines of the American Society of Mammalogists (<http://www.mammalsociety.org/committees/animal-care-and-use>). Each month the traps were active from 5:00 pm to 7:00 am, for 2–4 consecutive nights. Bats were identified to the species (or species complex) level using the available identification keys for African bats [39, 40]. All bat flies found on the captured bats were immediately collected with fine forceps and stored in liquid nitrogen for research purposes, including virus screening (not presented in this paper). Bats were released

at the cave entrance after bat fly collection. At the International Centre for Medical Research in Franceville (CIRMF), bat fly specimens were taxonomically identified under a binocular microscope, using the identification keys Theodor [30, 35]. Despite the storage in liquid nitrogen, morphological features were well preserved. Once identified, bat fly specimens collected from a single bat individual were grouped in mono-specific pools (i.e. a single bat fly species per pool) containing up to nine fly specimens (i.e. the maximum number of conspecific fly specimens recovered from a single bat). When bats were infested by more than one fly species, the number of pools per bat corresponded to the number of fly species. All pools were stored at -80 °C until analysis.

*Statistical analyses*

All statistical analyses were conducted using R v3.0.2 (<https://www.r-project.org/>). Analysis of variance (ANOVA) was used to compare the bat mean infestation rate and the mean number of bat flies per infested bat according to the bat species, by considering all caves together and separately. To assess the specific association between bat and bat fly species, Poisson generalized linear mixed models (GLMM) were fitted to the number of infested bats relative to the bat fly species, site and month of collection with a log link using the lme4 package [41]. The interaction between the two response variables, “bats” and “bat flies”, was fitted as a

fixed effect in the model. The random effects were “sites” and “months of collection” and both explanatory variables were nested to “bats” species. The significance of the “bats” × “bat flies” interaction was estimated by using the Akaike Information Criterion (AIC) [42] for model selection. AIC changes were evaluated when model parameters were modified (added or removed) [43]. Full-model averages with shrinkage, available in the MuMIn package [44], were used for AIC estimation. The best model showed  $\Delta AIC_C = 0$ ; however, a variation was considered significant according to the rule  $\Delta AIC_C < 2$  [45, 46].

#### *Molecular screening of Polychromophilus*

The presence of *Polychromophilus* parasites was investigated in single-species bat fly pools from a single host. First, pools were crushed in 300  $\mu$ l of cold 1× PBS using a ball-mill tissue grinder (Genogrinder 2000, Spex Centripep). Total DNA was extracted from 100  $\mu$ l of this homogenate with the Qiagen DNeasy Blood and Tissue kit, according to the manufacturer's instructions. A 835 bp fragment of the parasite mitochondrial cytochrome b (cyt b) gene was amplified using a nested-PCR procedure, as previously described [47], and the GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). PCR products (10  $\mu$ l) were visualized by electrophoretic migration on 1.5 % agarose gels in 1× TBE buffer, and positive amplicons were sent to Beckman Coulter Genomics (France) for bidirectional sequencing using original primers.

#### *Sequence analysis and the Maximum Likelihood Estimates of Infection Rate (MLE-IR)*

Geneious 7.0.6 (Biomatters, www.geneious.com) was used for sequence analysis (correction, alignment, mapping against reference sequences from GenBank). For phylogenetic analyses, maximum likelihood (ML) trees were constructed based on the alignment of our 835 bp sequences with a subset of previously published malaria parasite cyt b sequences (see Additional file 1: Table S1) for genus assignment. Conversely, for species assignment the amplified sequences were aligned with previously published *Polychromophilus* spp. cyt b sequences, but only a 314 bp long region was common to all these sequences and was used for alignment and tree construction. The best-fitting ML model under the Akaike Information Criterion was GTR (General Time Reversible) +  $\Gamma$  (Gamma distribution) + I (Invariable sites' distribution), as identified by Model Test [48]. The highest-likelihood DNA trees and corresponding bootstrap supporting values were obtained with PhyML (freely available at the ATGC bioinformatics platform <http://www.atgc-montpellier.fr/>) using NNI (Nearest Neighbor Interchange) + SPR (Subtree Pruning Regrafting) branch swapping and 100 bootstrap replicates [49]. Infection rates

(percentage of infected pools relative to the total number of screened pools) were calculated and the Maximum Likelihood Estimates of bat fly infection rates (MLE-IR) were computed with 99 % of confidence level using the MLE-IR program [50]. MLE-IR is a corrected estimate of the infection rate that takes into account the number of bat fly individuals present in each pool. For example, the MLE of a given bat fly species has to be understood as the percentage of infected flies relative to all screened individuals of that bat fly species.

## Results

#### *Bat diversity and abundance*

In total, 1,154 bats were captured and were assigned to five species/complexes: *Miniopterus inflatus* (n = 354), *Hipposideros gigas* (n = 317), *Hipposideros caffer* complex (n = 285), *Rousettus aegyptiacus* (n = 157) and *Coleura afra* (n = 41) (Table 1). Important qualitative (i.e. trapped bat species) and quantitative (i.e., trapped bat number) variations were observed between caves and only bats belonging to the *H. caffer* complex were captured in all four caves. Independently of seasonality, most *H. caffer* complex and *M. inflatus* specimens were captured in Kessipoughou and Djibilong caves, whereas *H. gigas* and *R. aegyptiacus* were more numerous in Kessipoughou and Zadie caves, respectively. *Coleura afra* was only captured in Faucon cave (Table 1). Bat capture rates (average number of bats captured per night) during the entire study period varied significantly among caves (ANOVA,  $F_{(3,56)} = 27.4$ ,  $P < 0.0001$ ), with mean nightly catches of 51.0, 45.5, 16.0 and 10.9 bats in Zadie, Faucon, Kessipoughou and Djibilong cave, respectively (Additional file 1: Table S2). Finally, although bats were sampled throughout the year in both Kessipoughou and Djibilong caves, their numbers significantly varied seasonally in Kessipoughou ( $\chi^2 = 152.9$ ,  $df = 11$ ,  $P < 0.0001$ ) and in Djibilong cave ( $\chi^2 = 267.3$ ,  $df = 11$ ,  $P < 0.0001$ ) (Additional file 1: Table S3).

#### *Bat fly diversity and bat infestation*

Bat examination allowed collecting 1,063 bat fly specimens (Table 1) that belonged to the families Streblidae (16.6 %) and Nycteribiidae (83.4 %). Among nycteribiid flies, three species were identified: *Nycteribia schmidlii* (73.3 %), *Eucampsipoda africana* (18.7 %) and *Penicilidia fulvida* (8.0 %). Three streblid fly species were detected: *Brachytarsina allaudi* (35.3 %), *Raymondia huberi* and a *Raymondia* species known as sp. A [30]. The two last species both belong to the *Raymondia huberi* group and together accounted for 64.7 % of all streblid flies (Table 1).

Bat flies were found on 439 (38.0 %) of the 1,154 collected bats. When considering all caves together, the mean infestation rate varied significantly according to the bat



**Table 1** Distribution of bat flies in the different caves and bat species. The number of flies of a given species found on each bat species and in each cave is shown. Numbers between brackets refer to the number of bats infested by a given bat fly species. For each cave, the sum of all infested bats by a given bat fly species is not necessarily equal to the total number of infested bats due to the co-infestation by different bat fly species of one bat individual.

	Bat species					All bat species
	C.a	H.c	H.g	M.i	R.a	
<b>Faucon cave</b>						
Total bat number	41	41	31	71	0	184
Total infested bat number	4	2	0	62	–	68
<i>E. africana</i>	0	2 (1)	–	0	–	2 (1)
<i>N. schmidlii scotti</i>	1 (1)	0	–	134 (55)	–	135 (56)
<i>P. fulvida</i>	4 (3)	1 (1)	–	25 (20)	–	30 (24)
<b>Zadie cave</b>						
Total bat number	0	66	77	0	111	254
Total infested bat number	–	1	0	–	31	32
<i>E. africana</i>	–	1 (1)	–	–	59 (31)	60 (32)
<b>Kessipoughou cave</b>						
Total bat number	0	90	209	126	40	465
Total infested bat number	–	41	50	84	29	204
<i>E. africana</i>	–	0	4 (3)	0	91 (26)	95 (29)
<i>N. schmidlii scotti</i>	–	8 (5)	4 (3)	187 (80)	11 (3)	210 (91)
<i>P. fulvida</i>	–	0	1 (1)	16 (13)	0	17 (14)
<i>R. huberi</i>	–	89 (35)	6 (6)	0	0	95 (41)
<i>B. allaudi</i>	–	2 (2)	53 (39)	2 (2)	1(1)	58 (44)
<b>Djibilong cave</b>						
Total bat number	0	88	0	157	6	251
Total infested bat number	–	12	–	120	3	135
<i>E. africana</i>	–	0	–	3 (1)	7 (2)	10 (3)
<i>N. schmidlii scotti</i>	–	2 (2)	–	306 (114)	2 (1)	310 (117)
<i>P. fulvida</i>	–	0	–	24 (17)	0	24 (17)
<i>R. huberi</i>	–	15 (10)	–	0	0	15 (10)
<i>B. allaudi</i>	–	0	–	2 (1)	0	2 (1)
<b>All caves</b>						
Total bat number	41	285	317	354	157	1154
Total infested bat number	4	56	50	266	63	439
<i>E. africana</i>	0	3 (2)	4 (3)	3 (1)	157 (59)	167 (65)
<i>N. schmidlii scotti</i>	1 (1)	10 (7)	4 (3)	627 (249)	13 (4)	655 (264)
<i>P. fulvida</i>	4 (3)	1 (1)	1 (1)	65 (50)	0	71 (55)
<i>R. huberi</i> group	0	104 (45)	6 (6)	0	0	110 (51)
<i>B. allaudi</i>	0	2 (2)	53 (39)	4 (3)	1 (1)	60 (45)

Abbreviations: C.a *Coleura afra*, H.c *Hipposideros caffer* complex, H.g *Hipposideros gigas*, M.i *Miniopterus inflatus*, R.a *Rousettus aegyptiacus*

species (ANOVA  $F_{(4,75)} = 13.15$ ,  $P < 0.0001$ ) (Table 2). Species-specific differences in bat infestation rate were confirmed also when each cave was considered on its own (Table 2). The infestation rates for a given bat species were similar in all caves. Only the *H. caffer* complex infestation rates in the Faucon and Zadie

caves and the *R. aegyptiacus* infestation rate in Zadie cave were much lower than in the other caves (Table 2). The mean number of bat flies collected per infested bat varied significantly according to the bat species (ANOVA  $F_{(4,1149)} = 88.28$ ,  $P < 0.0001$ ) (Table 3) both when all caves or each single cave were

**Table 2** Comparison of the mean infestation rates (%) in the different bat species

	M.i	H.c	H.g	R.a	C.a	ANOVA		
						F	df	P
All caves	74.21 ± 3.19	26.03 ± 6.61	23.97 ± 8.44	66.52 ± 9.72	4.43 ± 4.43	13.15	75	< 0.0001
Kessipoughou	69.74 ± 4.30	36.75 ± 11.07	38.36 ± 11.35	79.72 ± 11.81	na	4.65	33	0.008
Djibilong	78.14 ± 4.77	30.13 ± 11.57	na	62.50 ± 23.93	na	5.96	20	0.009
Faucon	76.06 ± 13.38	4.43 ± 4.43	0	na	4.43 ± 4.43	24.54	8	< 0.0001
Zadie	na	2.50 ± 2.50	0	27.90 ± 1.45	na	135.80	5	< 0.0001

Abbreviations: C.a Coleura afra, H.c Hipposideros caffer complex, H.g Hipposideros gigas, M.i Miniopertus inflatus, R.a Rousettus aegyptiacus, ANOVA, analysis of variance, F ANOVA F-statistic, df degrees of freedom, P P-value, na, not applicable (i.e. missing data)

considered. Moreover, the mean number of bat flies per infested bat of a given species was similar in all caves (Table 3).

To assess whether bat fly species were randomly distributed among bat species, generalized linear mixed models (GLMM) were used. Due to the low number of infested individuals (n = 4), C. afra bats were omitted from the overall analysis. The results revealed a strong association effect between bats and bat flies, which represent the most important parameters in the model (see Additional file 1: Table S4). Miniopertus inflatus was commonly and significantly infested by the bat fly species N. s. scotti (Z-value = 3.17, P < 0.0001) and P. fulvida (Z-value = 2.55, P = 0.01). On the other hand, E. africana flies (the other nycteribiid species) were preferentially associated with R. aegyptiacus (Z-value = 2.84, P < 0.0001). Similarly, species of the R. huberi group and B. allaudi were preferentially associated with bats belonging to the H. caffer complex and H. gigas, respectively. All five bat fly taxa were occasionally found on non-common hosts (up to 13 % for B. allaudi), suggesting that the preferential host-bat fly associations, even if strong, are not strict. Some of these occasional associations could result from accidental transfers of flies to non-usual hosts, including during the bat collection process (i.e. different species retained together into the catch bag of the harp trap). However, two bat fly species (E. africana in Faucon cave and B. allaudi in Djibilong cave) were recovered on non-preferred hosts in the absence of their preferred hosts, suggesting

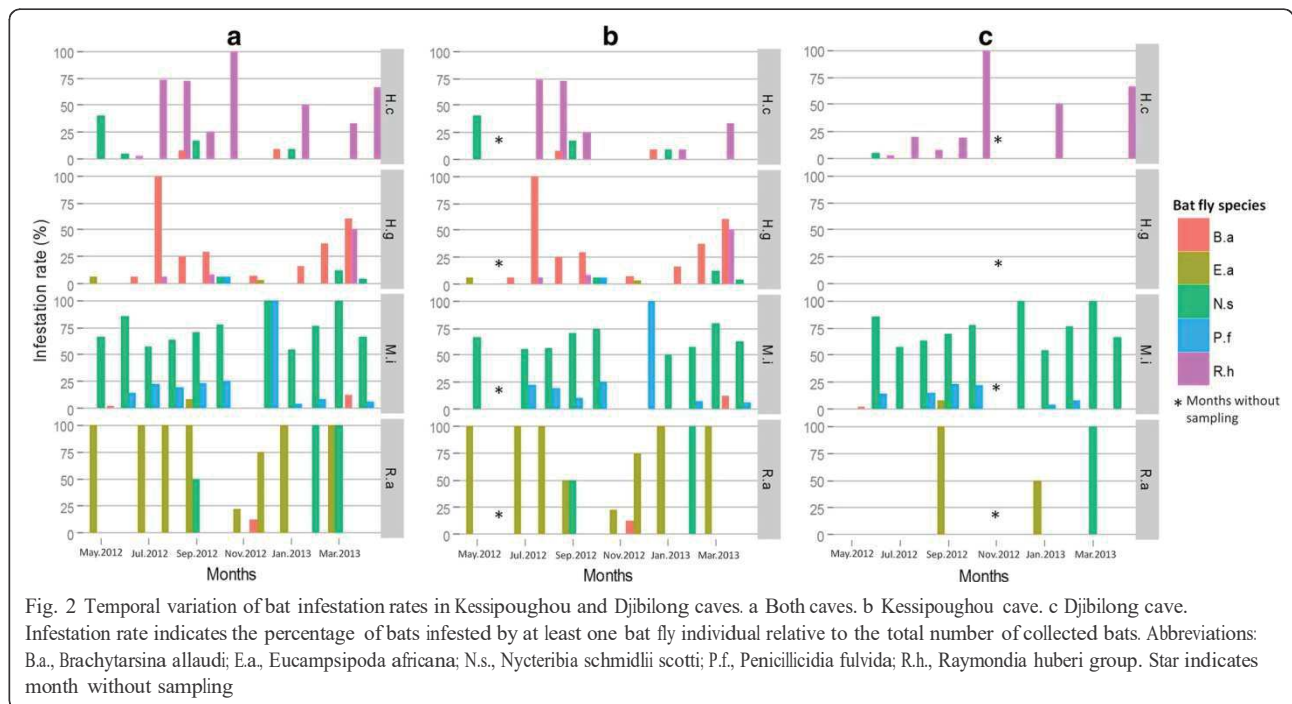
that these species can occasionally infest several bat species. Different bat fly species, mostly Nycteribiidae-Nycteribiidae associations (n = 36 N. schmidlii scotti with P. fulvida) on M. inflatus bats, were identified in 41 bats (9.3 % of all infested bats).

Temporal variations of the infestation rate were assessed by analyzing data only from Kessipoughou and Djibilong caves where sampling was done longitudinally. The infestation rate was calculated for each month, each bat species and each bat fly species (Fig. 2). When both caves were considered together, infestation rates varied significantly in time for H. caffer complex ( $\chi^2 = 299.4$ , df = 9, P < 0.0001), H. gigas ( $\chi^2 = 304.9$ , df = 9, P < 0.0001), M. inflatus ( $\chi^2 = 32.9$ , df = 10, P < 0.0001) and R. aegyptiacus ( $\chi^2 = 249.7$ , df = 10, P < 0.0001) (Additional file 1: Table S5 and Fig. 2a). However, in both Kessipoughou and Djibilong caves, M. inflatus bats seemed to be continuously infested by N. schmidlii scotti and P. fulvida, whereas H. caffer complex, H. gigas and R. aegyptiacus bats were more frequently infected by R. huberi group, B. allaudi and E. africana flies, respectively (Fig. 2a). When considering the two caves separately, infestation rates still significantly changed throughout the year (Additional file 1: Table S5 and Fig. 2b, c). However, infested H. gigas specimens were mostly collected in Kessipoughou. Although infestation rates varied in both caves throughout the year, the mean number of flies per infested bat remained stable (all ANOVA P-values > 0.05) over the year, whatever the bat species (Additional file 1: Table S6).

**Table 3** Mean number of bat flies per infested bat in the different bat species

	M.i	H.c	H.g	R.a	C.a	ANOVA		
						F	df	P
All caves	1.97 ± 0.09	0.42 ± 0.06	0.21 ± 0.03	1.08 ± 0.13	0.12 ± 0.06	88.28	1149	< 0.0001
Kessipoughou	1.62 ± 0.15	1.10 ± 0.17	0.32 ± 0.04	2.57 ± 0.37	na	39.51	461	< 0.0001
Djibilong	2.13 ± 0.15	0.19 ± 0.06	na	1.50 ± 0.71	na	40.55	248	< 0.0001
Faucon	2.23 ± 0.19	0.07 ± 0.05	0	na	0.12 ± 0.06	52.20	180	< 0.0001
Zadie	na	0.01 ± 0.01	0	0.53 ± 0.08	na	21.89	251	< 0.0001

Abbreviations: C.a Coleura afra, H.c Hipposideros caffer complex, H.g Hipposideros gigas, M.i Miniopertus inflatus, R.a Rousettus aegyptiacus, ANOVA, analysis of variance, F ANOVA F-statistic, df degrees of freedom, P P-value, na, not applicable (i.e. missing data)



### Molecular screening and dynamics of *P. melanipherus* infection

Infection by haemosporidian parasites was assessed in the 416 bat fly pools that originated from 375 infested bats captured in Faucon ( $n = 37$ ), Zadio ( $n = 11$ ), Kessipoughou ( $n = 221$ ) and Djibilong cave ( $n = 147$ ). Haemosporidian parasites were detected in 75 pools from three of the four caves: 5 from Faucon (13.51 %), 27 from Kessipoughou (12.21 %) and 43 from Djibilong cave (29.25 %). Based on mtDNA *cyt b* sequencing and phylogenetical analysis, all haemosporidian parasites were identified as *Polychromophilus melanipherus* (Figs. 3 and 4).

The MLE-IR values (see Additional file 1: Table S7) indicated that *P. melanipherus* was mainly detected in *N. schmidlii scotti* and *P. fulvida* bat flies (both nycteribiid species) and less frequently in *E. africana*, *R. huberi* group and *B. allaudi*. Most ( $n = 71$ ) infected bat flies pools were from *M. inflatus* bats (63 pools of *N. schmidlii scotti*, 8 pools of *P. fulvida*), and the other four positive pools included flies collected from *C. afra* (one *N. schmidlii scotti* pool), *H. caffer* complex (one *B. allaudi* and one *R. huberi* group pool) and *R. aegyptiacus* (one *E. africana* pool) bats. Among all bat fly taxa, infected *N. s. scotti* specimens were detected almost each month in both Kessipoughou (Fig. 5a) and Djibilong (Fig. 5b) cave, whereas infected *P. fulvida* bats peaked three to four times during the year. Conversely, infected *E. africana*, *B. allaudi* (in Kessipoughou cave) and *R. huberi* group animals (in Djibilong cave) were only found occasionally.

Analysis of the *P. melanipherus* *cyt b* sequences identified 18 segregation sites that defined eight distinct

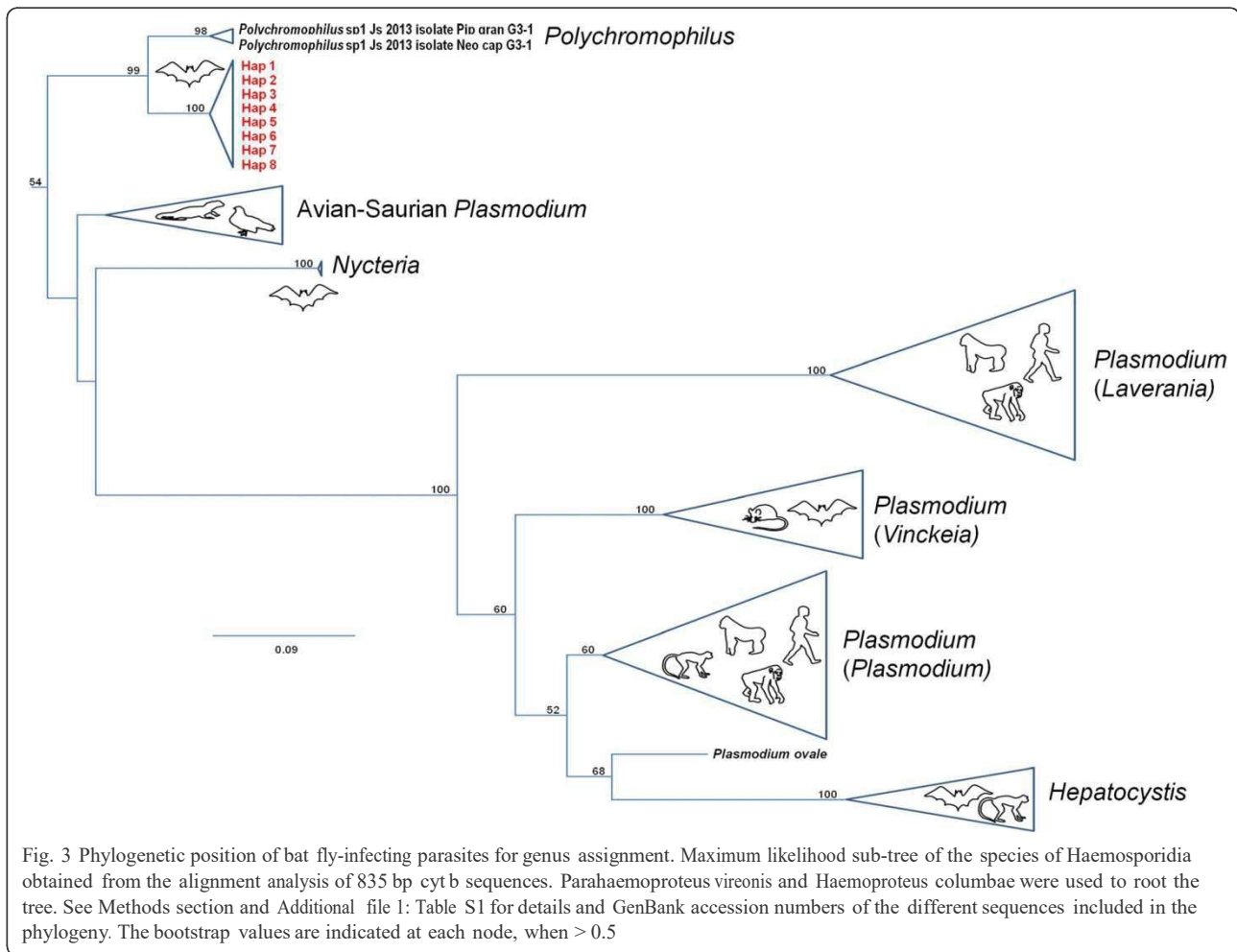
haplotypes (Hap1 to Hap8; see Additional file 1: Table S8). Hap1 (46.7 %), Hap2 (34.7 %) and Hap3 (12 %) were the most frequent, whereas Hap4 to 8 accounted for less than 2 %/each. Hap1 and 2 were similarly detected in all caves, whereas Hap3 was restricted to Kessipoughou and Djibilong caves (Additional file 2: Fig. S1). Hap5 and 7 were found only in Kessipoughou cave, and Hap4, 6 and 8 were only detected in Djibilong cave (Additional file 2: Fig. S1).

## Discussion

### Bat fly diversity and host preference

The Nycteribiidae and Streblidae fauna of Gabon has been poorly studied, with only a single species (*P. fulvida*) reported so far [51]. This study identified five new bat fly species found on cave-dwelling bats: two Nycteribiidae (*N. schmidlii scotti* and *E. africana*) and three Streblidae (*B. allaudi* and two species of the *R. huberi* group).

This is the first record of *E. africana* in Central Africa. This species was previously reported in West (Sierra Leone), East (Kenya) and South Africa (Botswana and the Republic of South Africa), where it infests mainly *R. aegyptiacus* and more rarely *Eidolon helvum* bats [30]. The two other nycteribiid species (*N. schmidlii scotti* and *P. fulvida*) have been already described in Central (Cameroon and Congo-Brazzaville), West (Nigeria), East (Kenya, Sudan) and South Africa (Republic of South Africa, Zimbabwe), where they infest many cave-dwelling bat species, mainly of the genus *Miniopterus* (both *N. schmidlii scotti* and *P. fulvida*) and also of the genera *Nycteris* (*N. schmidlii scotti*), *Pipistrellus*

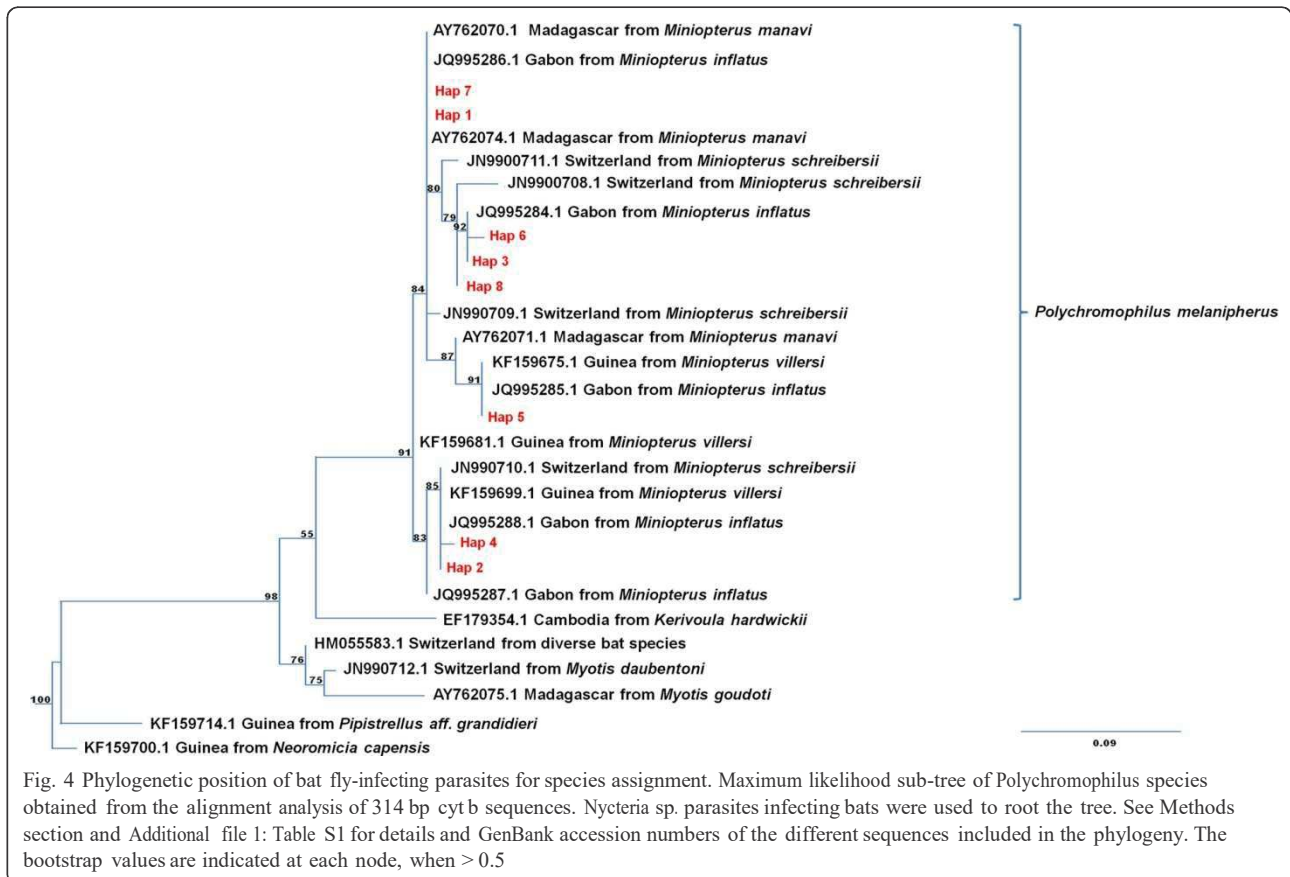


(*N. schmidlii scotti*), *Eptesicus* (*Nycteribia* sp.), *Eidolon* (*P. fulvida*), *Vespertilio* (*P. fulvida*), *Rhinolophus* and *Hipposideros* (both *N. schmidlii scotti* and *P. fulvida*) [14, 15, 30, 34]. The three streblid species detected in this study (*B. allaudi* and the two species of the *R. huberi* group) have never been reported in Central Africa, but have been documented in East Africa, where they infest mainly bats of the genus *Hipposideros*, and less frequently of the genera *Cardioderma*, *Triaenops* (*R. huberi* group) and *Epomophorus* (*B. allaudi*) [35].

All five bat fly species were found in the Kessipoughou and Djibilong caves, but not in the Faucon and Zadié caves. This could be explained by sampling variations or by qualitative and quantitative differences in bat species assemblages in each cave. Five bat species were captured, all of which were previously reported in Gabon [52] and are known to roost in cave-dwelling habitats across the African continent [4]. However, bat communities can vary according to the cave type, and the presence/absence of a particular bat species probably depends on the habitat suitability inside and around each cave. For example, *R. aegyptiacus* and *M. inflatus*

were absent in Faucon and Zadié cave respectively, whereas *C. afra* was only captured in Faucon cave. The fruit bat *R. aegyptiacus* generally selects ecological environments with abundant fruit trees and dark roosts [53]. Therefore, Faucon cave, with its large entrance and chimney bringing light deep inside the main chamber is less suitable for *R. aegyptiacus*. Bats of the genus *Miniopterus* prefer moister caves [54, 55], which probably explains their presence in Faucon cave (a very moist cave), and their absence in Zadié cave which is much dryer (personal observation).

Modulation of the bat fly community composition by the bat community in a given environment requires the existence of some degrees of bat fly preference for host bat species. Bat flies exhibit a high degree of host-specificity [56] and most species infest only a single bat species or phylogenetically related bats species [31, 56, 57]. This host specialization is the result of long co-evolutionary processes that led to morphological, behavioral and physiological adaptations of bat flies and also to the development of immunocompatibility between bat flies and their primary host and to the frequent vertical transfer



of bat flies from adult bats to their offspring [29, 56]. Here, we found that each bat fly species identified in Gabon caves is preferentially associated with a single main host. *Nycteribia schmidlii* scotti and *P. fulvida* were both preferentially associated with *M. inflatus*; *E. africana* with *R. aegyptiacus*; the *R. huberi* group with *H. caffer* complex and *B. allaudi* with *H. gigas*. On the other hand, *C. afra* was infested by *N. schmidlii* scotti and *P. fulvida*, but no preferential association with either fly species could be identified because of the low number of parasitized specimens. However, a previous study reported infestation of *C. afra* by *P. fulvida* in other regions of the world [58]. Despite the apparent specificity between bats and bat flies, we recorded some associations involving one or more non-primary hosts that could have originated from natural infestation or accidental transfers. Accidental transfers from the primary to an accidental host can occur during bat sampling [56], especially through contact between bat species in the bag of the harp trap. Nevertheless this route can be ruled out in Faucon and Djibilong caves where *E. africana* and *B. allaudi* were recovered on accidental hosts in the absence of their respective primary host. Complementary analysis, including blood meal identification, should be done to determine whether accidental hosts can really serve as secondary hosts.

#### Temporal heterogeneity of bat infestation rate and abundance

The main consequence of this host preference is the interdependence of the bat and bat fly communities in space and time. Indeed, although the mean number of bat flies per bat remained stable over time, the infestation rates at the Kessipoughou and Djibilong caves significantly changed during the year. This suggests that the infestation rate (i.e. the way bat flies spread within bat communities) is a better parameter to assess bat fly parasitism. The infestation rate variations seemed to mirror the size changes in the collected bat populations throughout the year. Additional and more accurate investigations on the abundance of bat fly species relative to climatic conditions and intrinsic bat parameters (e.g. ecology, physiology) should be performed. Nevertheless it is obvious that infestation rate variations can significantly influence the transmission dynamics of bat fly-borne pathogens, particularly *P. melanipherus*.

Bats were collected throughout the year in Kessipoughou and Djibilong caves; however significant variations in bat abundance were observed according to the sampling month. Similar observations were reported for *H. caffer* complex bats in Uganda [59] and for other cave-dwelling bat species across the world [60], where a decrease of bat



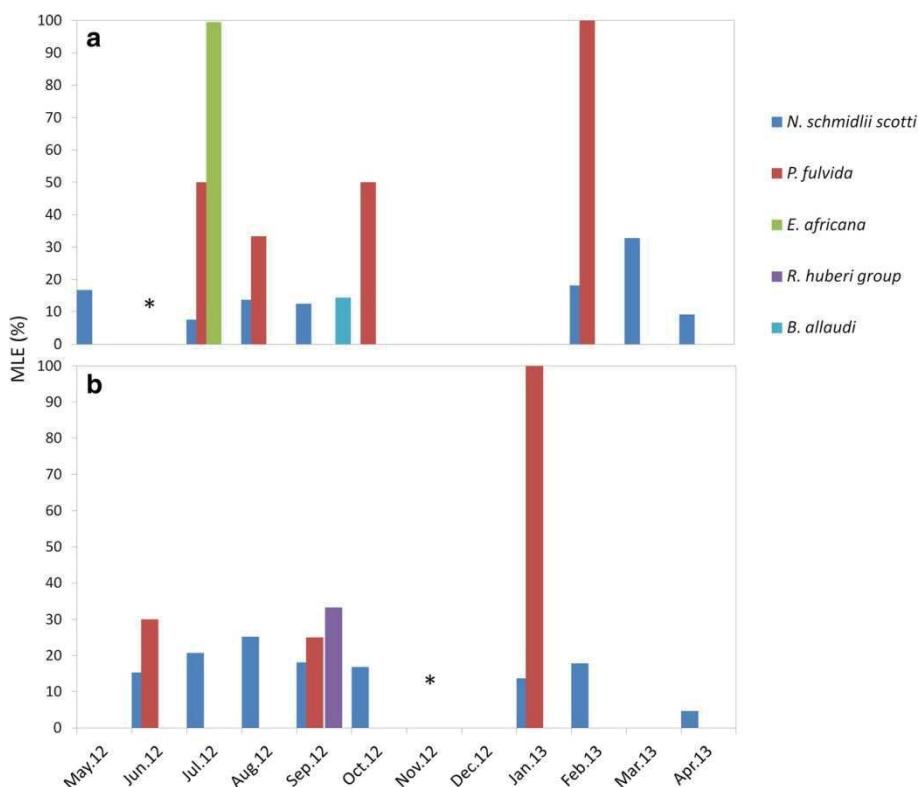


Fig. 5 Polychromophilus melanipherus Maximum Likelihood Estimates of the infection rate (MLE) dynamics in Kessipoughou and Djibilong caves. a Kessipoughou cave. b Djibilong cave. Star indicates month without sampling

trapping was recorded during the rainy season, which negatively affects bat exit. Alternatively, the decrease in the number of captured bats could indicate a reduction in the bat populations inside the caves due to migratory events [61–63] or behavioral changes related to parturition, which influences the exit, especially of female bats that rest in nurseries located deeper in caves [4]. In Afro-tropical regions, particularly in Gabon, parturition events occur mainly in March (e.g. *H. caffer* complex) and in October (most cave-dwelling bat species) [59, 61, 64] and a sampling reduction was observed in these months.

*Detection, spatial and temporal dynamics of P. melanipherus infection*

The role of some nycteribiid species as vector of Polychromophilus parasites has previously been demonstrated in cave ecosystems of tropical [15] and temperate areas [36, 37, 65]. Our molecular screening provided evidence for the presence of *P. melanipherus* in *N. s scotti* and *P. fulvida* bat flies. The respective infection rates strongly suggest that both species are involved in *P. melanipherus* transmission in Gabon. This hypothesis is strengthened by a previous parasitological study in the Faucon cave showing a high prevalence of *P. melanipherus* in *M. inflatus*, a bat

we found to be preferentially infested by *N. s scotti* and *P. fulvida* [38]. This study also demonstrated that *P. melanipherus* infection was restricted to *M. inflatus* in accordance with the finding that the range of *P. melanipherus* hosts is limited to bats belonging to the family Miniopteridae [66]. Unexpectedly, we detected *P. melanipherus* infections also in a small number of bat fly pools (one pool for each taxon: *N. schmidlii scotti*, *E. africana*, *B. allaudi* and *R. huberi group*) collected on non-Miniopteridae bats (*H. caffer* complex, *R. aegyptiacus* and *C. afra* from the families Hipposideridae, Pteropodidae and Emballonuridae). This implies that, given the strong specificity of *P. melanipherus* for Miniopteridae, the infected *E. africana*, *B. allaudi* and *R. huberi group* bat fly specimens acquired the parasite during a blood meal on *M. inflatus*, which is not their primary host. Therefore, host switching leading to blood-feeding really occurs and bat flies can occasionally infest non-primary hosts.

This is the first time that *P. melanipherus* is identified in *N. s scotti*, *E. africana*, *B. allaudi* and *R. huberi group* bat flies. However, its detection in the whole body of these bat flies is not enough to definitively prove their role in *P. melanipherus* transmission. Further studies,

including the detection of *Polychromophilus* parasites at the infecting stage in salivary glands, are needed to confirm their potential role as vectors. To date, streblid flies have never been found to transmit haemosporidian parasites. Nevertheless, a recent study revealed the presence of infecting stages of a bat malaria parasite (*Vetufefrbus ovatus*) in a fossilized specimen of streblid fly [67].

Our results indicate that there is no significant difference in bat fly *P. melanipherus* infection rates between caves, suggesting quite similar spatial patterns of *P. melanipherus* transmission. However, *P. melanipherus* infection rates varied in time in the Kessipoughou and Djibilong caves. This could mirror the transmission dynamics of this malaria parasite in these caves that seems to follow the temporal variations in bat infestation. The long-term dynamics of haemosporidian infections in bat flies and bat colonies are poorly documented in tropical areas. However, a previous study in Faucon cave showed that the highest *P. melanipherus* infection rates coincide with the months of heavy bat infestation by bat flies [38].

## Conclusion

The present work describes the cave-dwelling bat fly fauna of Gabon and highlights some host preference trends for each reported bat fly species. Bat fly assemblage in caves was related to the bat population composition and the infestation rates varied during the year. Our investigation brings insights into *N. schmidlii* scotti and *P. fulvida* involvement in the transmission of *Polychromophilus* parasites.

## Additional files

Additional file 1: Tables S1 to S8. (DOCX 62 kb)

Additional file 2: Figure S1. *Polychromophilus melanipherus* haplotype distribution. Pie charts showing the *P. melanipherus* haplotype distribution in the Faucon, Kessipoughou and Djibilong caves. No *P. melanipherus* infection was detected in bat flies collected from bats captured in Zadie cave. (TIF 845 kb)

## Abbreviations

AIC, akaike information criterion; ANOVA, analysis of variance; bp, base pair; cyt b, cytochrome b gene; df, degrees of freedom; DNA, deoxyribonucleic acid; F, ANOVA F-statistic; GLMM, generalized linear mixed models; GTR, general time reversible; ML, maximum likelihood; MLE-IR, maximum likelihood estimates of infection rates; mtDNA, mitochondrial deoxyribonucleic acid; na, not applicable; NNI, nearest neighbor interchange; P, P-value; PBS, Phosphate-buffered saline; PCR, polymerase chain reaction; SPR, subtree pruning regrafting; TBE, tris borate EDTA

## Acknowledgements

We acknowledge the editor and anonymous reviewers for comments that greatly improved previous versions of this article. We are also very grateful to the Agence Nationale des Parcs Nationaux (ANPN) and the Centre National de la Recherche Scientifique et Technologique (CENAREST) of Gabon that approved this study and facilitated access to the different sites. We thank Mr. Roger Kowe, André Delicat, Lilian-Brice Mangama Koumba, Boris Makanga and Davy Jiolle for their technical assistance in the field and laboratory and Carlo Constantini for his support in statistical analysis. We are grateful to the

Poungui Canton Association (ACP, Lastourville, Gabon) and we deeply thank The Ranch of Lekabi staff (Gabon) and his director Pascal Pommeret to whom we specially dedicate this article.

## Funding

This work was co-funded by the Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF), Global Viral Forecasting Initiative - METABIOTA and the "Programme Pilote Régional Forêts Tropicales Humides" (PPR FTH) housed at the Institut de Recherche pour le Développement (IRD).

## Availability of data and material

Nucleotide sequences reported in this paper are available in the GenBank database under accession nos. KU182361–KU182368.

## Authors' contribution

JON, EML, DF, and CP designed research; JON, NR, MB, PY, GDM, and CP performed the research; JON, FP, DA and CP analyzed data, and JON, DA and CP wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Consent for publication

Not applicable.

## Ethics approval and consent to participate

All bat and bat fly collections were authorized by the Ministère de la Recherche Scientifique et du Développement Technologique du GABON (authorizations N° AR0006/12/MENERSI/CENAREST/CG/CST/CSAR and N° AR0011/13/MENERSI/CENAREST/CG/CST/CSAR).

## Author details

<sup>1</sup>Laboratoire MIVEGEC, UMR 224–5290 CNRS-IRD-UM, IRD Montpellier, Montpellier, France. <sup>2</sup>Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF), Franceville, Gabon. <sup>3</sup>Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD), UPR AGIRS, F-34398 Montpellier, France. <sup>4</sup>Institut Pasteur du Cambodge, Phnom Penh, Cambodia.

Received: 29 April 2016 Accepted: 2 June 2016

Published online: 10 June 2016

## References

- Kohl C, Kuth A. European bats as carriers of viruses with zoonotic potential. *Viruses-Basel*. 2014;6(8):3110–28.
- Shi ZL. Emerging infectious diseases associated with bat viruses. *Sci China Life Sci*. 2013;56(8):678–82.
- Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV, Schountz T. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(3):531–45.
- ACR. AfricanBats, Pretoria. 2014. <http://www.africanbats.org>. Accessed 4 Aug 2014.
- Adam JP. Transmission d'haemosporidies par des anophèles cavernicoles dans les grottes du Congo (Brazzaville). *B World Health Organ*. 1965;32:598–602.
- Adam JP, Landau I. Plasmodium voltaicum au Congo-Brazzaville. *J Parasitol*. 1970;56(4):391–3.
- Duval L, Robert V, Csorba G, Hassanin A, Randrianarivelosia M, Walston J, et al. Multiple host-switching of Haemosporidia parasites in bats. *Malaria J*. 2007;6:157.
- Kuzmin IV, Niezgodza M, Franka R, Agwanda B, Markotter W, Breiman RF, et al. Marburg virus in fruit bat, Kenya. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(2):352–4.
- Lips M. Anophèles du Congo, faune des grottes et des anfractuosités. *Riv Parasitologia*. 1960;21(4):290–306.
- Leleup N. Description de deux grottes du Bas-Congo. *Notes Biospéologiques*. 1956;11:73–80.
- Olival KJ, Stoner EO, Perkins SL. Detection of Hepatocystis sp. in southeast asian flying foxes (Pteropodidae) using microscopic and molecular methods. *J Parasitol*. 2007;93(6):1538–40.
- Rosin G, Landau I, Hugot JP. Considerations on the genus Nycteria (Haemoproteidae) parasite of African Microchiroptera with the description of 4 new species (author's transl). *Ann Parasitol Hum Comp*. 1978;53(5):447–59.
- Landau I, Adam JP. Two types of schizonts of Hepatocystis sp., a parasite of insectivorous bats in the Congo-Brazzaville. *T Roy Soc Trop Med H*. 1973;67(1):6–7.



14. Adam JP, Landau I. Polychromophilus sp. Hemoproteidea parasite de Microchiroptères au Congo. *Cah ORSTOM Ser Ent Med Parasitol.* 1973; 11(2):147–52.
15. Adam JP, Landau I. Developmental stages of Polychromophilus sp., a parasite of insectivorous bats from the Congo-Brazzaville, in the nycteribiid fly *Penicillidia fulvida* Bigot 1889. *T Roy Soc Trop Med H.* 1973;67(1):5–6.
16. Ayala SC, Bradbury J, Bradbury S. Hepatocystis in *Hypsignathus monstrosus* (Pteropinea) in Gabon I. Hepatocystis malaria in a hammerhead bat population in Gabon, West Africa. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1981;56(1):21–2.
17. Landau I, Chavatte JM, Karadjian G, Chabaud A, Beveridge I. The haemosporidian parasites of bats with description of *Sprattiella alecto* gen. nov., sp. nov. *Parasite.* 2012;19:137–46.
18. Mattingly PF, Adam JP. A new species of cave-dwelling anopheline from the French Cameroons. *Ann Trop Med Parasit.* 1954;48(1):5–7.
19. Abonnenc E. Sur un anophèle cavernicole de la Guinée: *Anopheles cavernicolus* n. sp. (Diptera-Culicidae). *Bulletin et Mémoires de l'École Préparatoire de Médecine et de Pharmacie de Dakar. Parasitologie.* 1954;11:4–6.
20. Mouchet J, Gariou J, Rivola E. Observations sur la biologie d'*Anopheles smithii* var. *rageai* Mattingly et Adam 1954, vecteur d'un Plasmodium de mammifère aux environs de Yaoundé (Sud-Cameroun). *Bull Soc Pathol Exot.* 1957;50(1):157–64.
21. Vattier-Bernard G. Les Ceratopogonidae des grottes de la République du Congo. *Annales de Spéléologie.* 1966;21(3):711–73.
22. Vattier-Bernard G, Adam JP. Connaissances actuelles sur la répartition géographique des phlébotomes cavernicoles africains; Considérations sur l'habitat et la biologie. *Annales de Spéléologie.* 1969;24(1):143–61.
23. Vattier-Bernard G. Contribution à l'étude systématique et biologique des phlébotomes cavernicoles en Afrique intertropicale (1ère partie). *Cah ORSTOM Ser Ent Med Parasitol.* 1970;8(2):175–230.
24. Vattier-Bernard G. Contribution à l'étude systématique et biologique des phlébotomes cavernicoles en Afrique intertropicale (2ème partie). *Cah ORSTOM Ser Ent Med Parasitol.* 1970;8(3):231–88.
25. Vattier-Bernard G. Etudes morphologique et biologique des phlébotomes cavernicoles du Congo-Brazzaville. *Annales de Spéléologie.* 1971;26(1):149–71.
26. Lucan RK, Bandouchova H, Bartonicka T, Pikula J, Zahradnikova A, Zukal JJ, Martinkova N. Ectoparasites may serve as vectors for the white-nose syndrome fungus. *Parasite Vector.* 2016;9:16.
27. Witsenburg F, Schneider F, Christophe P. Epidemiological traits of the malaria-like parasite *Polychromophilus murinus* in the Daubenton's bat *Myotis daubentonii*. *Parasite Vector.* 2014;7:566.
28. Hagan HR. Embryology of the viviparous insects. New York: Ronald Press; 1951.
29. Dick CW, Patterson BD. Bat flies: Obligate ectoparasites of bats. In: Morand S, Krasnov B, Poulin, editors. *Micromammals and Macroparasites.* Tokyo: Springer; 2006. p. 179–94.
30. Theodor O. An illustrated catalogue of the Rothschild collection of Nycteribiidae (Diptera) in the British Museum (Natural History). London: British Museum (Natural History); 1967.
31. Wenzel RL, Tripton VJ. Some relationships between mammal hosts and their ectoparasites. In: Wenzel RL, Tipton VJ, editors. *Ectoparasites of Panama.* Chicago: Field Museum of Natural History; 1966. p. 677–723.
32. Marshall AG. The ecology of *Basilia hispida* (Diptera : Nycteribiidae) in Malaysia. *J Anim Ecol.* 1971;40:141–54.
33. Jobling B. Host-parasite relationship between the American Streblidae and the bats, with a new key to the American genera and the record the Strabliidae from Trinidad, British West Indies (Diptera). *Parasitology.* 1949;39:315–29.
34. Theodor O. The Nycteribiidae of the Ethiopian region and Madagascar. *Parasitology.* 1957;47:3–4.
35. Theodor O. A revision of the Streblidae (Diptera) of the Ethiopian Region. *Trans R ent Soc of Lond.* 1968;120(16):313–73.
36. Megali A, Yannic G, Christophe P. Disease in the dark: molecular characterization of *Polychromophilus murinus* in temperate zone bats revealed a worldwide distribution of this malaria-like disease. *Mol Ecol.* 2011;20(5):1039–48.
37. Gardner RA, Molyneux DH. *Polychromophilus murinus*: a malarial parasite of bats: life-history and ultrastructural studies. *Parasitology.* 1988;96(3):591–605.
38. Duval L, Mejean C, Maganga GD, Makanga BK, Mangama-Koumba LB, Peirce MA, et al. The chiropteran haemosporidian *Polychromophilus melanipherus*: a worldwide species complex restricted to the family Miniopteridae. *Infect Genet Evol.* 2012;12(7):1558–66.
39. Patterson BD, Webala PW. Keys to the Bats (Mammalia: Chiroptera) of East Africa. *Fieldiana Life Earth Sci.* 2012;6:1–60.
40. Monadjem AP, Taylor J, Schoeman MC. Bats of southern and central Africa: a biogeographic and taxonomic synthesis. Johannesburg: Wits University Press; 2010.
41. Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S. lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4. *J Stat Softw.* 2015;68(1):1–48.
42. Akaike H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans Automat Contr.* 1974;19(6):716–23.
43. Tene Fossog B, Ayala D, Acevedo P, Kengne P, Ngomo Abeso Mebuy I, Makanga B, et al. Habitat segregation and ecological character displacement in cryptic African malaria mosquitoes. *Evol Appl.* 2015;8(4):328–45.
44. Barton K. MuMIn: Multi-Model Inference. R package version 1.13.4. <http://CRAN.R-project.org/package=MUMIn>
45. Aderson DR, Burnham KP. Avoiding pitfalls when using information-theoretic methods. *J Wildl Manage.* 2002;66(3):912–8.
46. Burnham KP, Aderson DR. Multimodel inference. Understanding AIC and BIC in Model Selection. *Sociol Method Res.* 2004;33(2):261–304.
47. Prugnolle F, Durand P, Neel C, Ollomo B, Ayala FJ, Armathau C, et al. African great apes are natural hosts of multiple related malaria species, including *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(4):1458–63.
48. Posada D, Crandall KA. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics.* 1998;14:817–8.
49. Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol.* 2010;59(3):307–21.
50. Gu W, Lampman R, Novak RJ. Problems in estimating mosquito infection rates using MIR. *J Med Entomol.* 2003;40:595–6.
51. Landau I, Chabaud AG, Miltgen F, Baccam D. *Dionisia bunoi* n. g. n. sp., Haemosporidae parasite of the microchiropteran bat *Hipposideros cyclops* in Gabon (author's transl). *Ann Parasitol Hum Comp.* 1980;55(3):271–80.
52. Maganga GD, Bourgarel M, Ebang Ella G, Drexler JF, Gonzalez JP, Drosten C, et al. Is Marburg virus enzootic in Gabon? *J Infect Dis.* 2011;204:800–3.
53. Kwiecinski GG, Griffiths TA. *Rousettus aegyptiacus*. *Mamm Species.* 1999;611:1–9.
54. Brosset A. Les chiroptères du Haut-Ivindo. *Gabon Biologia Gabonica.* 1966;2:47–86.
55. Churchill S, Draper R, Marais E. Cave utilization by Namibian bats: Populations, microclimate and roost selection. *S Afr J Wildl Res.* 1997;27:44–50.
56. Dick CW, Patterson BD. Against all odds: explaining high host specificity in dispersal-prone parasites. *Int J Parasitol.* 2007;37(8–9):871–6.
57. Fritz GN. Biology and ecology of batflies (Diptera : Streblidae) on bats in the genus *Carollia*. *J Med Entomol.* 1983;20(1):1–10.
58. Haeselbarth E, Sererman J, Zumpt F. The arthropod parasites of vertebrates in Africa south of the Sahara (Ethiopian Region). Volume III. *Insecta excl. Phthiraptera.* *S Afr Inst Med Res.* 1966;13(52):1–283.
59. Mutere FA. Breeding cycles in tropical bats in Uganda. *J Anim Ecol.* 1968;37:8–9.
60. Torres-Flores JW, López-Wilchis R, Soto-Castruita A. Dinámica poblacional, selección de sitios de percha y patrones reproductivos de algunos murciélagos cavernícolas en el oeste de México. *Rev Biol Trop.* 2012;60(3):1369–89.
61. Brosset A. Cycles de reproduction des microchiroptères troglodytes du nord-est du Gabon. *Mammalia.* 1980;44(2):225–32.
62. Taylor PJ. Bats of southern Africa: Guide to biology, identification, and conservation. Durban: UKZN Press; 2000.
63. Miller-Butterworth CM, Eick G, Jacobs DS, Schoemanmcs MC, Harley EH. Genetic and phenotypic differences between South African long-fingered bats, with a global miniopertine phylogeny. *J Mammal.* 2005;86(6):1121–35.
64. Kurta A, Kunz TH. Size of bats at birth and maternal investment during pregnancy. *Symp Zool Soc Lond.* 1987;79–106.
65. Mer GG, Goldblum N. A haemosporidian of bats. *Nature.* 1947;159:439–44.
66. Gamham PCC. Malaria parasites and other Haemosporidia. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1966.
67. Poinar Jr GO. *Vetuefrus ovatus* n. gen., n. sp. (Haemospororida: Plasmodiidae) vectored by a streblid bat fly (Diptera: Streblidae) in Dominican amber. *Parasite Vector.* 2011;4:229.

**Table S1:** Published sequences of the different malaria parasites used for phylogenetic analysis.

Parasite	Host	Country	GenBank Accession Number	additional information	Phylogenetical Analysis
<i>Plasmodium gallinaceum</i>	Birds	Viet Nam	AY099029	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Plasmodium relictum</i>	Birds	United States of America	AY733090	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Plasmodium floridense</i>	Lizards		EF079654	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Plasmodium minuoviridae</i>	Lizards	Papua New Guinea	EU834703	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Plasmodium giganteum</i>	Lizards	Ghana	AY099053	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Plasmodium berghei</i>	Rodents	Democratic Republic of Congo	DQ414645	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Plasmodium chabaudi</i>	Rodents	Central African Republic	DQ414649	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Plasmodium vinckei</i>	Rodents	Democratic Republic of Congo	DQ414651	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Plasmodium yoelii</i>	Rodents	Central African Republic	DQ414660	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Plasmodium sp</i>	Bats	Guinea	KF159671	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Plasmodium sp</i>	Bats	Liberia	KF159710	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Plasmodium knowlesi</i>	Asian Monkeys, Humans		AY722797	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Plasmodium fragile</i>	Asian Monkeys		AY722799	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Plasmodium cynomolgi</i>	Asian Monkeys		AY800108	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Plasmodium inui</i>	Asian Monkeys		AB354572	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Plasmodium hylobati</i>	Gibbons		AB354573	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Plasmodium simiovale</i>	Asian Monkeys		AB434920	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Plasmodium coatneyi</i>	Asian Monkeys		AB354575	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Plasmodium vivax</i>	Gorillas, Chimpanzees, Humans		NC007243	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Plasmodium simium</i>	New World Monkeys		NC007233	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Plasmodium sp</i>	African Monkeys		AY800112	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Plasmodium gonderi</i>	African Monkeys		AB434918	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Plasmodium malariae</i>	Chimpanzees, Humans		AB354570	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Plasmodium ovale</i>	Chimpanzees, Humans		AB354571	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Plasmodium adleri</i>	Gorillas	Cameroon	HM235284	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Plasmodium blacklocki</i>	Gorillas	Democratic Republic of Congo	HM235376	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Plasmodium gaboni</i>	Chimpanzees	Gabon	FJ895307	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Plasmodium billbrayi</i>	Chimpanzees	Democratic Republic of Congo	GQ355468	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Plasmodium billcollinsi</i>	Chimpanzees	Democratic Republic of Congo	GQ355479	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Plasmodium reichenowi</i>	Chimpanzees		NC002235	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Plasmodium praefalciparum</i>	Gorillas	Democratic Republic of Congo	HM235308	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Plasmodium praefalciparum</i>	Gorillas	Cameroon	HM235367	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Plasmodium falciparum</i>	African Monkeys	Gabon	JF923762	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Plasmodium falciparum</i>	Gorillas	Gabon	JF923761	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Plasmodium falciparum</i>	Chimpanzees	Democratic Republic of Congo	GQ355474	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Plasmodium falciparum</i>	Humans		AY282930	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Hepaticystis sp</i>	Bats		DQ396527	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Hepaticystis sp</i>	Bats	Liberia	KF159712	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Hepaticystis sp</i>	Bats	Guinea	KF159683	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Hepaticystis sp</i>	Bats	Guinea	KF159695	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Hepaticystis sp</i>	African Monkeys	Ethiopia	AF069626	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Nycteria sp</i>	Bats	Guinea	KF159690	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Nycteria sp</i>	Bats	Ivory Coast	KF159720	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Haemoproteus columbae</i>	Birds		NC012448	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Parahaemoproteus vireonis</i>	Birds		FJ168561	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Polychromophilus sp</i>	Bats	Guinea	KF159714	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Polychromophilus sp</i>	Bats	Guinea	KF159700	-	Analysis1 (835 bp)
<i>Polychromophilus melanipherus</i>	<i>Miniopterus schreibersii</i>	Switzerland	JN990708.1	haplotype 3	Analysis 2 (314 bp)
<i>Polychromophilus melanipherus</i>	<i>Miniopterus schreibersii</i>	Switzerland	JN990709.1	haplotype 4	Analysis 2 (314 bp)
<i>Polychromophilus melanipherus</i>	<i>Miniopterus schreibersii</i>	Switzerland	JN990710.1	haplotype 5	Analysis 2 (314 bp)
<i>Polychromophilus melanipherus</i>	<i>Miniopterus schreibersii</i>	Switzerland	JN990711.1	haplotype 6	Analysis 2 (314 bp)
<i>Polychromophilus melanipherus</i>	<i>Miniopterus inflatus</i>	Gabon	JQ995284.1	haplotype 1	Analysis 2 (314 bp)
<i>Polychromophilus melanipherus</i>	<i>Miniopterus inflatus</i>	Gabon	JQ995288.1	haplotype 5	Analysis 2 (314 bp)
<i>Polychromophilus melanipherus</i>	<i>Miniopterus inflatus</i>	Gabon	JQ995287.1	haplotype 4	Analysis 2 (314 bp)
<i>Polychromophilus melanipherus</i>	<i>Miniopterus inflatus</i>	Gabon	JQ995285.1	haplotype 2	Analysis 2 (314 bp)
<i>Polychromophilus melanipherus</i>	<i>Miniopterus inflatus</i>	Gabon	JQ995286.1	haplotype 3	Analysis 2 (314 bp)

<i>Polychromophilus melanipherus</i>	<i>Miniopterus manavi</i>	Madagascar	AY762071.1	-	Analysis 2 (314 bp)
<i>Polychromophilus melanipherus</i>	<i>Miniopterus manavi</i>	Madagascar	AY762070.1	-	Analysis 2 (314 bp)
<i>Polychromophilus melanipherus</i>	<i>Miniopterus manavi</i>	Madagascar	AY762074.1	-	Analysis 2 (314 bp)
<i>Polychromophilus melanipherus</i>	<i>Miniopterus villiersi</i>	Guinea	KF159681.1	-	Analysis 2 (314 bp)
<i>Polychromophilus melanipherus</i>	<i>Miniopterus villiersi</i>	Guinea	KF159699.1	-	Analysis 2 (314 bp)
<i>Polychromophilus melanipherus</i>	<i>Miniopterus villiersi</i>	Guinea	KF159675.1	-	Analysis 2 (314 bp)
<i>Polychromophilus murinus</i>	<i>Myotis goudoti</i>	Madagascar	AY762075.1	-	Analysis 2 (314 bp)
<i>Polychromophilus murinus</i>	<i>Myotis daubentonii</i>	Switzerland	JN990712.1	-	Analysis 2 (314 bp)
<i>Polychromophilus murinus</i>	<i>Myotis daubentonii</i>	Switzerland	HM055583.1	-	Analysis 2 (314 bp)
<i>Polychromophilus sp.</i>	<i>Kerivoula hardwickii</i>	Cambodia	EF179354.1	-	Analysis 2 (314 bp)
<i>Polychromophilus sp.</i>	<i>Pipistrellus aff. grandidieri</i>	Guinea	KF159714.1	-	Analysis 2 (314 bp)
<i>Polychromophilus sp.</i>	<i>Neoromicia capensis</i>	Guinea	KF159700.1	-	Analysis 2 (314 bp)
<i>Nycteria sp.</i>	<i>Rhinolophus landeri</i>	Guinea	KF159690	-	Analysis 2 (314 bp)
<i>Nycteria sp.</i>	<i>Rhinolophus alcyone</i>	Guinea	KF159720	-	Analysis 2 (314 bp)
<i>Polychromophilus melanipherus</i>	<i>Nycteribia schmidlii scotti</i> , <i>Penicilidia fulvida</i> , <i>Eucampsipoda africana</i> , <i>Brachytarsina allaudi</i>	Gabon	KU182361	haplotype 1	Analysis 1&2
<i>Polychromophilus melanipherus</i>	<i>Nycteribia schmidlii scotti</i> , <i>Penicilidia fulvida</i> , <i>Raymondia huberi</i> group	Gabon	KU182362	haplotype 2	Analysis 1&2
<i>Polychromophilus melanipherus</i>	<i>Nycteribia schmidlii scotti</i>	Gabon	KU182363	haplotype 3	Analysis 1&2
<i>Polychromophilus melanipherus</i>	<i>Nycteribia schmidlii scotti</i>	Gabon	KU182364	haplotype 4	Analysis 1&2
<i>Polychromophilus melanipherus</i>	<i>Penicilidia fulvida</i>	Gabon	KU182365	haplotype 5	Analysis 1&2
<i>Polychromophilus melanipherus</i>	<i>Nycteribia schmidlii scotti</i>	Gabon	KU182366	haplotype 6	Analysis 1&2
<i>Polychromophilus melanipherus</i>	<i>Nycteribia schmidlii scotti</i>	Gabon	KU182367	haplotype 7	Analysis 1&2
<i>Polychromophilus melanipherus</i>	<i>Nycteribia fulvida</i>	Gabon	KU182368	haplotype 8	Analysis 1&2

Haplotypes are presented with the name used in the original studies. The last eight haplotypes (in bold) are from the present study and were submitted as a unique sequence to GenBank (with a single accession number), but some of them were detected in different bat fly species. Dash indicates non available information.

**Table S2:** Bat density per species and per cave, measured as the mean number of bats per night (5pm - 7am).

	Cave				ANOVA		
	Faucon	Zadie	Kessipoughou	Djibilong	F	df	P-value
<i>Coleura afra</i>	10.2 ± 5.5	Na	Na	Na	Na	Na	Na
<i>Hipposideros caffer</i>	10.2 ± 2.2	16.7 ± 3.6	6.2 ± 1.5	5.5 ± 1.3	4.7	3	0.007
<i>Hipposideros gigas</i>	7.7 ± 3.8	15.4 ± 4.6	10.8 ± 2.2	Na	0.7	2	0.4
<i>Miniopterus inflatus</i>	17.2 ± 6.5	Na	5.9 ± 1.2	7.1 ± 1.2	5.1	2	0.009
<i>Rousettus aegyptiacus</i>	Na	22.4 ± 4.6	2.6 ± 0.6	1.0 ± 0.0	32.5	2	< 0.001
Total	45.5 ± 1.51	51.0 ± 2.7	16.0 ± 2.1	10.9 ± 1.9	27.4	3	< 0.001

**Na:** not applicable (i.e., bat species not recovered or free of bat fly infestation). **ANOVA:** Analysis of variance. **F:** F-statistical value of the ANOVA. **df:** degrees of freedom.

The total and species-specific density of captured bats varied significantly between caves, but for *H. gigas*.

**Table S3:** Seasonal variation of the number of bats collected in the Kessipoughou and Djibilong caves.

	Months												Chi 2	df	p-value
	2012-05	2012-06	2012-07	2012-08	2012-09	2012-10	2012-11	2012-12	2013-01	2013-02	2013-03	2013-04			
<b>Kessipoughou</b>	49	*	44	44	69	22	4	75	34	55	26	43	152.9	11	< 0.001
<b>Djibilong</b>	10	83	19	33	30	10	*	1	26	27	6	6	267.3	11	< 0.001

**df:** degree of freedom; Star indicates month without sampling

**Table S4:** Evaluation of the Poisson generalized linear mixed models fitted to estimate the effect of the bat-bat fly association.

Model rank	Model terms (fixed effects)				AIC <sub>c</sub>	ΔAIC <sub>c</sub>
	Intercept	Bat species	Bat fly species	Bat x bat fly		
8	-3,491	+	+	+	714.6	--
4	-2,491	+	+		1393.8	679.18
3	-0,910		+		1394.7	680.04
2	-1,741	+			1675.5	960.85
1	-0,160				1676.5	961.87

Fixed effects included in the full model (Model No. 8) are the factors 'Bat species', 'Bat fly species' and their interaction. Crosses (+) indicate the occurrence of a term in the model. Random effects of all models are 'Sites' (caves) and 'Month of Collection', nested within 'Bat species'. The models are ranked according to the increasing values of the second-order bias correction Akaike information criterion (AIC<sub>c</sub>). The ΔAIC<sub>c</sub> was calculated by comparing the AIC<sub>c</sub> model with the model with the minimum AIC<sub>c</sub>. The best model was selected when ΔAIC<sub>c</sub> > 2 [44].

Partie 2 : Mémoire expérimental | Diversité des diptères hématophages ectoparasites de chauves-souris cavernicoles du Gabon et implication dans la transmission d'hémosporidies

**Table S5:** Bat infestation rate (%) variations throughout the year.

	May.2012	Jun.2012	Jul.2012	Aug.2012	Sep.2012	Oct.2012	Nov.2012	Dec.2012	Jan.2013	Feb.2013	Mar.2013	Apr.2013	Chi 2	df	p-value
<b>Both caves</b>															
M.i	66.7	44.2	60.8	60.5	70.0	76.9	Na	100	55.6	70	86.7	68.4	32.9	10	< 0.001
H.c	6.9	8.1	60	0.5	32.1	100	Na	Na	23	0	33.3	66.7	299.4	9	< 0.001
H.g	6.2	Na	11.7	100	33.3	41.2	Na	10.4	0	16.2	87.5	60	304.9	9	< 0.001
R.a	100	0	100	100	100	Na	22.2	75	75	100	100	0	249.7	10	< 0.001
<b>Kessipoughou</b>															
M.i	66.7	*	66.7	62.5	70.7	75	Na	100	50	57.1	80	68.7	23.9	9	0.004
H.c	10.5	*	73.3	72	50	Na	Na		18.18	0	33.3	Na	140.1	6	< 0.001
H.g	6.2	*	11.7	100	33.3	58.3	Na	10.4	0	16.2	87.5	60	302.2	9	< 0.001
R.a	100	*	100	100	100	Na	22.3	75	100	100	100	0	157.4	9	< 0.001
<b>Djibilong</b>															
M.i	Na	83.6	57.14	73.68	84.61	77.8	*	100	58.3	76.9	100	66.7	25.08	9	0.002
H.c	0	8.1	20	7.69	18.75	100	*	Na	50	0	Na	66.7	320.2	8	< 0.001
H.g	Na	Na	Na	Na	Na	Na	*	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na
R.a	Na	0	Na	Na	100	Na	*	Na	50	Na	100	Na	20	2	< 0.001

**M.i:** *Miniopterus inflatus*; **H.c:** *Hipposideros caffer* complex; **H.g:** *Hipposideros gigas*; **R.a:** *Rousettus aegyptiacus*; **C.a:** *Coleura afra*. **df:** degrees of freedom. **Na:** not applicable (i.e., bat species not recovered or free of bat fly infestation).

Star indicates month without sampling. The mean infestation rates of bats varied significantly according to the bat species for the two caves taken together and also in each single cave.

**Table S6:** Mean number of bat flies per infested bat throughout the year.

	May.201	Jun.201	Jul.201	Aug.201	Sep.201	Oct.201	Nov.201	Dec.201	Jan.201	Feb.201	Mar.201	Apr.201	ANOVA		
	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	F	d f	p- value
<b>Both caves</b>															
<b>M.i</b>	1.0 ± 0.0	2.7 ± 0.2	2.9 ± 0.5	2.1 ± 0.2	2.6 ± 0.2	3.8 ± 0.5	Na	1.0 ± 0.0	2.1 ± 0.3	3.1 ± 0.4	2.3 ± 0.4	2.7 ± 0.4	1.5	10	0.1
<b>H.c</b>	2.5 ± 1.5	1.0 ± 0.0	2.8 ± 0.8	2.5 ± 0.2	1.2 ± 0.2	1.0 ± 0.0	Na	Na	1.6 ± 0.6	Na	1.0 ± 0.0	3.0 ± 1.0	1.4	8	0.1
<b>H.g</b>	2.0 ± 0.0	Na	1.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0	1.7 ± 0.4	1.2 ± 0.1	Na	1.0 ± 0.0	Na	1.3 ± 0.2	1.5 ± 0.2	1.3 ± 0.1	1.2	8	0.3
<b>R.a</b>	4.4 ± 0.5	Na	7.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0	4.0 ± 1.5	Na	2.5 ± 1.5	3.1 ± 1.0	2.3 ± 0.8	2.0 ± 1.0	3.0 ± 0.7	Na	1.1	8	0.3
<b>Kessipoughou</b>															
<b>M.i</b>	1.0 ± 0.0	*	2.8 ± 1.0	1.9 ± 0.4	2.4 ± 0.2	4.0 ± 0.0	Na	1.0 ± 0.0		3.6 ± 1.0	1.8 ± 0.2	2.7 ± 0.4	1.5	9	0.1
<b>H.c</b>	2.5 ± 1.5	*	2.9 ± 0.7	2.6 ± 0.2	1.3 ± 0.3	Na	Na	Na	2.0 ± 1.0	Na	1.0 ± 0.0	Na	1.1	5	0.3
<b>H.g</b>	2.0 ± 0.0	*	1.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0	1.7 ± 0.4	1.2 ± 0.1	Na	1.0 ± 0.0	Na	1.3 ± 0.2	1.5 ± 0.2	1.3 ± 0.1	1.2	8	0.3
<b>R.a</b>	4.4 ± 0.5	*	7.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0	4.5 ± 2.5	Na	2.5 ± 1.5	3.1 ± 1.0	Na	2.0 ± 1.0	3.3 ± 0.8	Na	1.1	8	0.3
<b>Djibilong</b>															
<b>M.i</b>	Na	2.7 ± 0.2	2.8 ± 1.0	2.2 ± 0.3	3.1 ± 0.6	3.7 ± 0.8	*	1.0 ± 0.0	2.3 ± 0.4	2.9 ± 0.4	3.2 ± 1.1	3.0 ± 2.0	0.6	9	0.7
<b>H.c</b>	Na	1.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	*	Na	1.0 ± 0.0	Na	Na	3.1 ± 1.0	2.8	6	0.1
<b>H.g</b>	Na	Na	Na	Na	Na	Na	*	Na	Na	Na	Na	Na	N a	N a	Na
<b>R.a</b>	Na	Na	Na	Na	3.0 ± 0.0	Na	*	Na	4.0 ± 0.0	Na	2.0 ± 0.0	Na	N a	N a	Na

**M.i:** *Miniopterus inflatus*; **H.c:** *Hipposideros caffer* complex; **H.g:** *Hipposideros gigas*; **R.a:** *Rousettus aegyptiacus*; **C.a:** *Coleura afra*. **df:** degrees of freedom. **Na:** not applicable (i.e., bat species not recovered or free of bat fly infestation). **ANOVA:** Analysis of variance

Star indicates month without sampling

The result of the ANOVA shows that the mean number of bat flies per infested bat did not vary significantly (p-value > 0.5) during the year in the two caves taken together and also in each cave.



**Table S7:** Number of Infected Pools (NIP) and Maximum Likelihood Estimates of Infection Rate (MLE-IR) of bat fly species.

	NIP	MLE-IR (%)
<i>N. schmidlii scotti</i>	64	12
<i>P. fulvida</i>	8	11.3
<i>E. africana</i>	1	0.5
<i>R. huberi group</i>	1	1.8
<i>B. allaudi</i>	1	1.7

**Table S8:** Haplotype of the *P. melanipherus* mtDNA cytochrome b sequences found in *Nycteribia schmidlii scotti* and *Penicilidia fulvida* bat flies collected in the four caves in Gabon

Haplotypes	<i>cyt b</i> polymorphic sites															Haplotype frequencies										
	27	36	105	115	129	193	225	256	257	280	339	345	371	390	418	450	456	595	729	784	799	n	Faucou	Kessipoughou	Djibibong	
KF159699.1																										
Hap_1 [KU182361]																						35	2	15	18	
Hap_2 [KU182362]																						26	3	7	16	
Hap_3 [KU182363]																						9	0	3	6	
Hap_4 [KU182364]																						1	0	0	1	
Hap_5 [KU182365]																						1	0	1	0	
Hap_6 [KU182366]																						1	0	0	1	
Hap_7 [KU182367]																						1	0	1	0	
Hap_8 [KU182368]																						1	0	0	1	

Only polymorphic positions are shown, and are numbered based on the published *P. melanipherus* *cyt b* sequence [KF159699.1] from *Miniopterus villiersi* collected in Guinea [54]. In brackets: GenBank accession numbers.

Figure S1

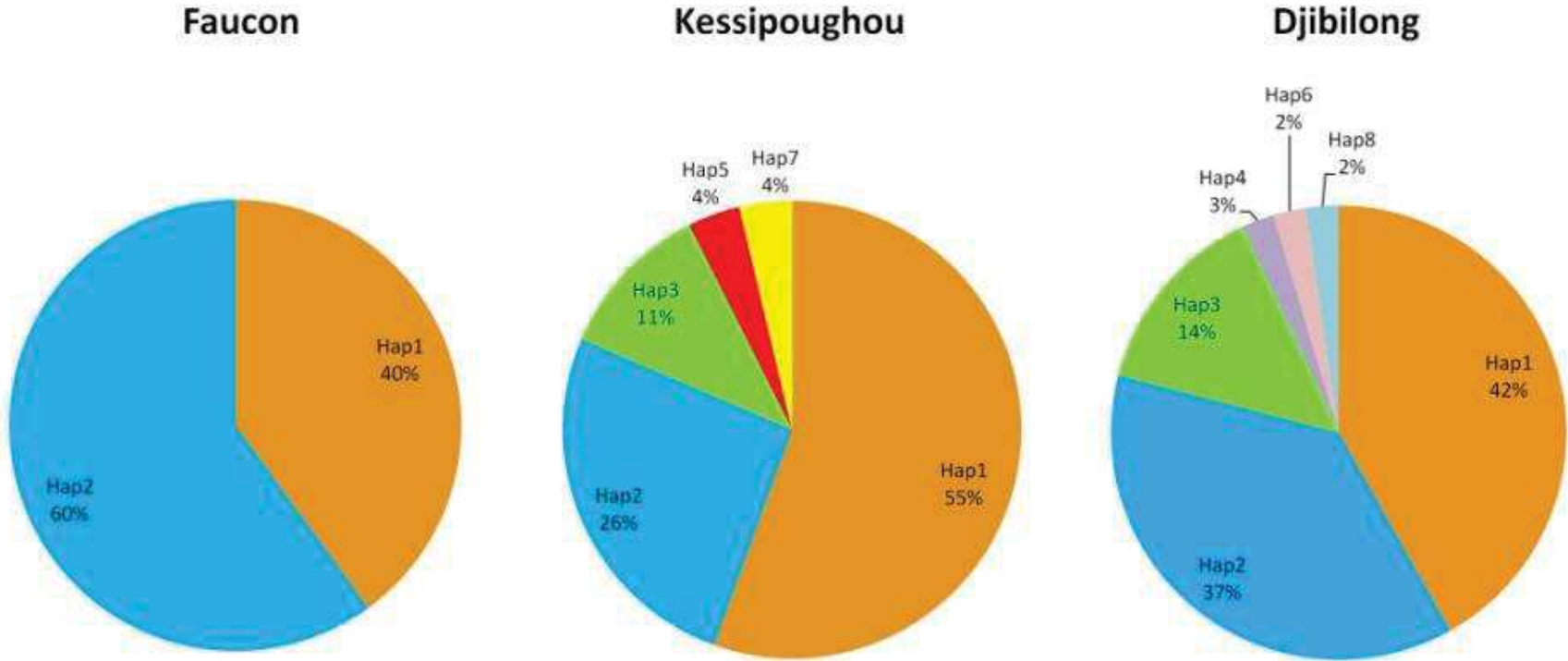


Figure S1. *P. melanipherus* haplotype distribution.

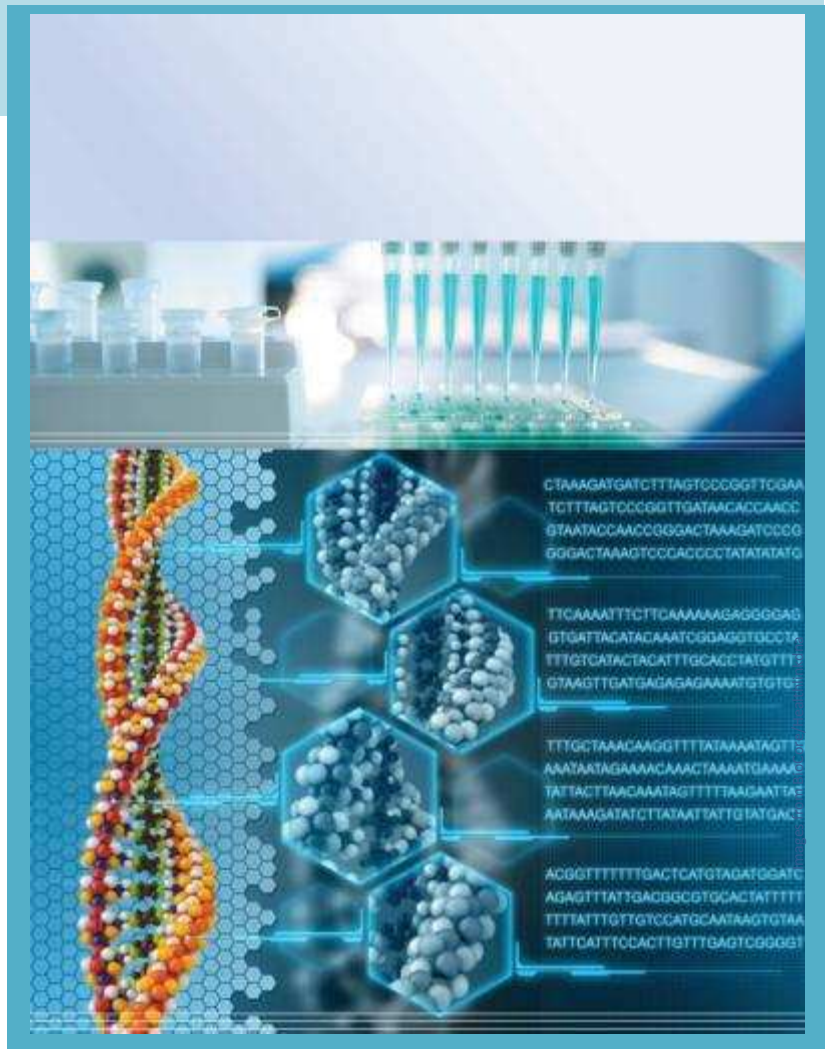
Pie charts showing the *P. melanipherus* haplotype distribution in the Faucon, Kessipoughou and Djibilong caves. No *P. melanipherus* infection was detected in bat flies collected from bats captured in Zadie cave.



## Chapitre 7

# Étude des communautés virales et bactériennes des diptères hématophages cavernicoles du Gabon : implication dans la transmission

Dans ce chapitre, nous présentons la diversité des virus et des bactéries potentiellement transmis par les diptères hématophages cavernicoles des grottes investiguées dans cette étude. Ces agents infectieux ont été recherchés via une approche de métagénomique basée une méthode séquençage à haut débit.



## 7.1. Contexte et objectifs

La lutte contre les maladies virales zoonotiques requiert une surveillance des virus à potentiel zoonotique au sein de la faune fréquentant les environnements anthropisés, et ce en amont de leur passage chez l'homme. Cette surveillance concerne les animaux vertébrés potentiellement réservoirs, mais aussi les arthropodes hématophages susceptibles de jouer un rôle de vecteur (veille entomologique) dans des environnements à grand risque zoonotique, notamment au niveau des interfaces entre les sphères sauvages et anthropiques. Ainsi, les grottes, lorsqu'elles sont anthropisées, constituent des milieux à haut risque zoonotique du fait de l'abondance de certains vertébrés, en particulier de chauves-souris qui sont connues pour héberger une importante diversité microbienne et virale. Les virus représentent une part importante des agents infectieux impliqués dans les émergences zoonotiques. Bien que l'usage des techniques de biologie moléculaire comme la PCR ait permis la mise en évidence d'un grand nombre de virus à partir de la faune sauvage, les nouvelles techniques de criblage basées sur le séquençage à haut débit offrent un énorme potentiel pour l'exploration sans *a priori* du virome de la faune cavernicole, et ainsi d'avoir accès à une multitude de données nouvelles sur la diversité virale d'un écosystème et ce bien au-delà des possibilités précédemment offertes par les approches conventionnelles. En Afrique centrale, et en particulier au Gabon, bien que des études de criblage de virus aient été entreprises chez les chauves-souris cavernicoles, l'effort d'exploration du compartiment arthropode est resté quasiment vierge. De façon similaire, peu d'investigations ont concerné le bactériome de l'entomofaune cavernicole. Afin de contribuer à cet effort nous avons initié une étude dans les grottes du Gabon afin d'explorer la diversité de virus et de bactéries dans les diptères hématophages et d'identifier parmi eux ceux pouvant faire l'objet d'une transmission vectorielle.

## 7.2. Approche méthodologique

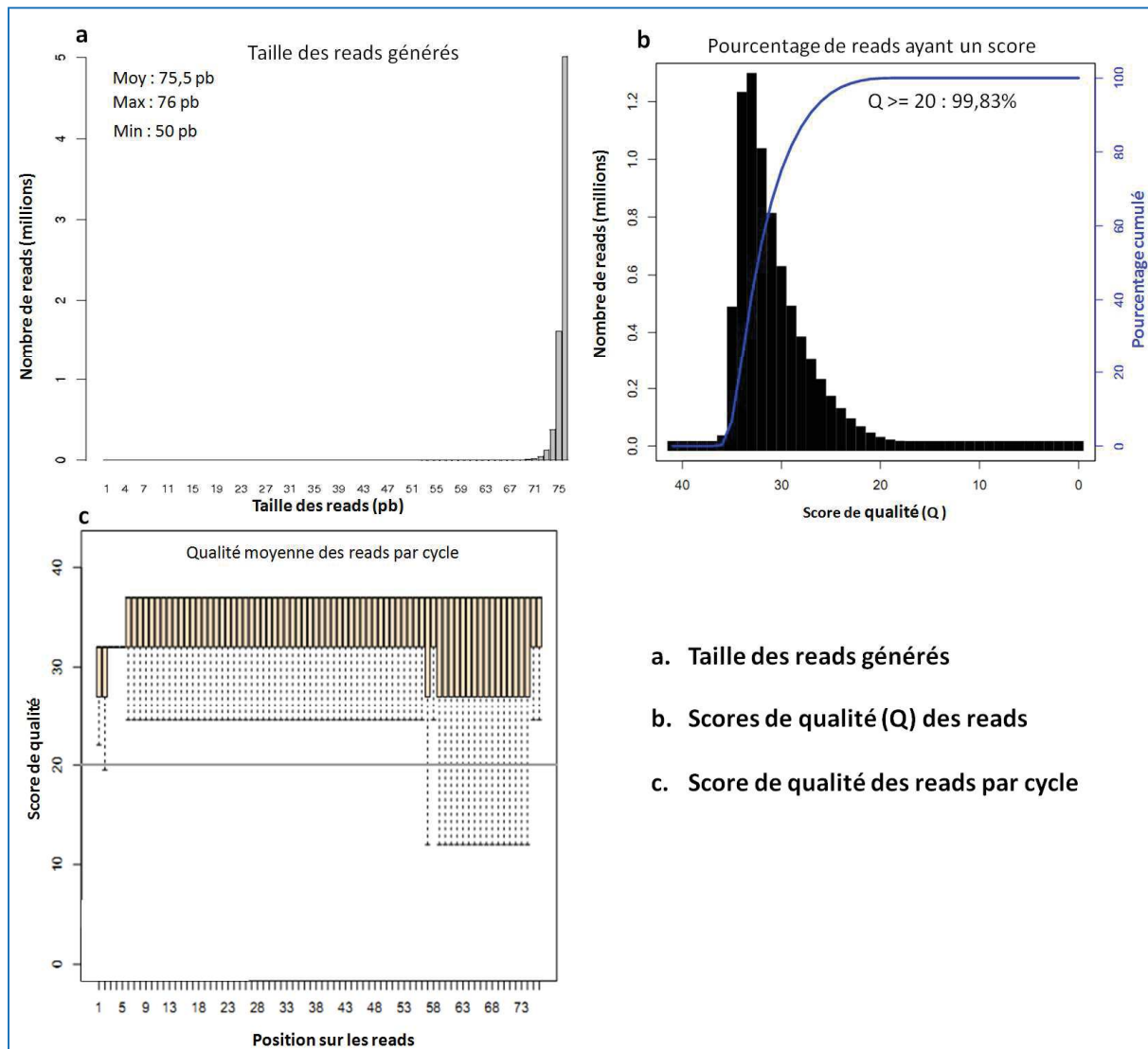
Nous avons réalisé le criblage viral et bactérien à partir d'ARNs que nous nous avons extraits de 28 lots de diptères chacun composés d'au maximum 100 individus. Ces lots correspon-daient à des Culicidae (21 lots dont 19 mono-spécifiques et 2 mixtes), à des Phlebotominae (5 lots mono spécifiques) et à des Ceratopogonidae (2 lots de mono spécifiques). L'ensemble des lots était uniquement constitué de femelles issues des grottes de Kessipoughou et Djibilong. Les extractions d'ARNs et le criblage par NGS (préparation des librairies et séquençage) ont été réalisés à l'aide d'une série de kits commerciaux en suivant les procédures recommandées par les fabricants (cf. Chapitre 4). Le criblage réalisé a consisté à séquencer et à analyser le transcriptome (c'est-à-dire l'ensemble des ARNs transcrits) des diptères afin de détecter des transcrits correspondant à des agents infectieux. Compte tenu de contraintes de temps et de coûts, nous avons réalisé un premier séquençage de chaque lot avec une profondeur de 5 millions de reads d'une longueur de 75 pb en moyenne. Après des étapes de nettoyage, la restriction des séquences ribosomiques (comprenant les séquences de diptères), puis d'assemblage des reads, l'assignation taxonomique des agents infectieux présents dans les échantillons a été réalisée par comparaison des séquences obtenues (reads ou contigs) avec celles des séquences disponibles dans les bases de données du domaine public (*NCBI*) à l'aide des outils bioinformatiques *METATAX* pour exploration du virome et *EDGE* pour l'exploration du bactériome (cf. Chapitre 4).

## 7.3. Résultats

### *Criblage viral*

Sur l'ensemble des 28 lots analysés, 16 lots, dont 9 lots de moustiques sur un total de 21, et la totalité des lots de phlébotomes (5) de cératopogonides (2), ont

fourni des résultats de séquençage exploitables avec des scores de qualité élevés pour la majorité des séquences générées (Figure 33). Des artefacts de séquençage pourraient expliquer les données manquantes.



**Figure 33** : Scores de qualité des reads générés à la profondeur de 5 millions de reads



L'analyse des données de séquençage par METATAX a généré des contigs et des reads en singleton non redondant avec ceux ayant été assemblés. Ainsi en raison de l'hétérogénéité de la taille des contigs générés par rapport aux reads singletons, nous avons quantifié l'ensemble des séquences par rapport au nombre total de bases assignées (issus des contigs et des reads). Sur la base de nos résultats, nous avons procédé à l'analyse du virome des diptères au niveau taxonomique de la famille. L'analyse des 16 lots (Tableau III), a permis d'identifier 211 reads et 48 contigs correspondant à un total de 23 821 bases assignées à 9 familles virales et une proportion de 1,59% ( 381/23 821 bases) des bases assignées à des virus non classés dans une famille.

**Tableau III** : Nombre de lots par espèce de diptères analysés

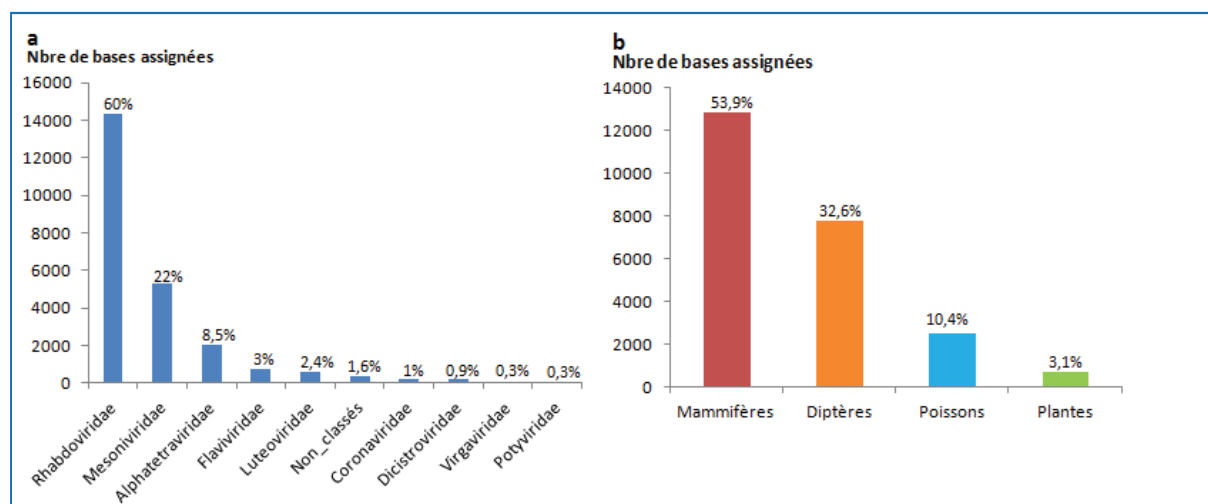
Espèces de diptères	<i>Cx. rima</i> group	<i>Ur.</i> <i>nigromaculata</i>	<i>Cx.</i> <i>quasiqiarti</i>	<i>Ur.</i> <i>cavernicola</i>	<i>Lu.</i> <i>tigripes</i>	Culicidae Mixtes *	<i>Ph.</i> <i>rodhaini</i>	<i>Sl.</i> <i>gigas</i>	<i>C. trifasciellus</i> group
Nombre d'individus criblés	124	161	148	74	23	52	88	324	56
Nombre de lots constitués	2	2	2	1	1	1	1	4	2

Les lots de taille variables sont constitués d'un maximum de 100 spécimens

\* : *Ur. bilineata*, *Ur. caliginosa*, *Ur. machadoi*, *Ur. chorleyi*, *Ur. alboabdominalis*, *Ur. caeruleocephala*, *Er. grahami*, *Er. chrysogaster*, *Lu. tigripes* et *Mi. plumosa*

Les séquences générées (reads et contigs) correspondaient en majorité à des virus de la famille des Rhabdoviridae (60%), à des Mesoniviridae (22%) et à des Alphetetraviridae (8,5%), tandis que les séquences correspondant à des Flaviviridae (3%), Coronaviridae (1%) et à des virus non assignés (1,6%) étaient minoritaires (Figure 34a).

La majorité des séquences (53,9%) correspondaient à des virus qui infectent naturellement les mammifères, tandis que 32,6% des séquences correspondaient à des virus d'insectes. Des séquences correspondant à des virus infectant des poissons (10,4%) et des plantes (3,1%) ont également été retrouvées dans les diptères (Figure 34b).



**Figure 34** : Familles virales détectées sur l'ensemble des lots criblés

Pour la suite de nos analyses nous nous sommes principalement intéressés aux virus infectant naturellement les mammifères, du fait du risque zoonotique qu'ils représentent. Parmi eux, les séquences correspondaient à des Rhabdoviridae (91,9%), à des Flaviviridae (3,9%), à des Coronaviridae (1,8%) et à des virus non assignés à une famille, mais appartenant au genre *Sobemovirus* (2,4%). Chez les diptères de la grotte de Kessipoughou, nous avons détecté des infections virales chez des moustiques des espèces *Ur. cavernicola*, *Ur. nigromaculata*, *Culex* du groupe *rima*, chez des phlébotomes de l'espèce *Sl. gigas*, et chez les *culicoides* du groupe *trifasciellus* (Tableau IV). Dans la grotte de Djibilong, ces infections ont été détectées chez des moustiques *Cx. quasiguiarti*, *Lu. tigripes*, dans un lot multi-espèces composés de d'*Ur. bilineata*, *Ur. caliginosa*, *Ur. machadoi*, *Ur. chorleyi*, *Ur. alboabdominalis*, *Ur. caeruleocephala*, *Er. grahami*, *Ur. Chrysogaster*, *Lu. tigries* et *Mi. plumosa* ; chez plusieurs espèces de phlébotomes *Sl. gigas*, *Ph. rodhaini* ; et chez les *Culicoides* du groupe *trifasciellus* (Tableau IV).

Sur l'ensemble des lots de diptères criblés, deux d'entre eux, dont un monospécifique (échantillon 1), constitué de moustiques appartenant à l'espèce *Ur. nigromaculata* (grotte de Kessipoughou), et un mixte (échantillon 2) constitué de moustiques appartenant aux espèces *Ur. bilineata*, *Ur. caliginosa*, *Ur. machadoi*, *Ur.*

*chorleyi*, *Ur. alboabdominalis*, *Ur. caeruleocephala*, *Er. grahami*, *Er. Chrysogaster*, *Lu. tigripes* et *Mi. plumosa* (grotte de Djibilong) ont présenté des proportions élevées de séquences virales assimilées aux virus Yaoundé (Flaviviridae) et Kamese (Rhabdoviridae). Ces résultats nous ont conduits à réaliser un séquençage complémentaire de ces deux échantillons avec une profondeur supplémentaire de 200 millions de reads.

**Tableau IV** : Virus détectés à une profondeur de séquençage de 5 millions de reads chez les diptères des grottes de Kessipoughou et Djibilong

Virus	Diptères	Kessipoughou		Djibilong	
		Reads	Bases assignées (pb)	Reads	Bases assignées (pb)
<b>Rhabdoviridae</b>	<i>Ur. cavernicola</i>	3	213	0	0
	<i>Ur. nigromaculata</i>	2	145	0	0
	<i>Cx. quasiguiarti</i>	0	0	1	74
	<i>Lot multi-espèces*</i>	0	0	24	2157
	<i>Sl. gigas</i>	9	663	9	657
	<i>Ph. rodhaini</i>	0	0	11	802
	<i>C. groupe trifasciellus</i>	22	3430	12	2832
<b>Flaviviridae</b>	<i>Ur. nigromaculata</i>	6	429	0	0
	<i>Lu. tigripes</i>	0	0	1	71
<b>Coronaviridae</b>	<i>Cx. groupe rima</i>	1	155	0	0
	<i>Ph. rodhaini</i>	0	0	1	74
<b>Sobemovirus</b>	<i>Cx. quasiguiarti</i>	0	0	2	307

Vert : Culicidae, Bleu : Phlebotominae, Rouge : Ceratopogonidae. \**Ur. bilineata*, *Ur. caliginosa*, *Ur. machadoi*, *Ur. chorleyi*, *Ur. alboabdominalis*, *Ur. caeruleocephala*, *Er. grahami*, *Ur. chrysogaster*, *Lu. tigries*, *Mi. plumosa*.

Ce séquençage a permis dans un premier temps de confirmer dans l'échantillon 1 la présence du virus Yaoundé, ou du moins d'un virus phylogénétiquement proche, avec un taux maximum de divergence des contigs de 13% au niveau nucléotidique par rapport au génome de référence (numéro d'accèsion Genbank : EU082199.2). Le nombre de bases assignées à ce Flaviviridae est ainsi passé de 429 lors du premier séquençage à 59 906 au cours du second séquençage à plus haute résolution (Tableau V). Dans un second temps, il a permis de confirmer la présence du virus Kamese dans l'échantillon 2, ou du moins d'un virus qui lui est très proche, avec un taux maximum de divergence des contigs de 6% au niveau nucléotidique par rapport au génome de référence de ce virus (numéro d'accèsion Genbank : KM204989.1). Le nombre de bases assignées à ce Rhabdoviridae est ainsi passé de 3 033 à 488 705 (Tableau V). La

majorité des séquences assignées à ces arbovirus ont présenté une répartition homogène sur leurs génomes respectifs avec des taux de couverture de 100% pour les virus Yaoundé et Kamese. Ce criblage à haute résolution nous a permis, par la même occasion, de mettre en évidence dans l'échantillon 1 deux séquences virales (298 bases assignées) correspondant à des virus de vertébrés de la famille des Adenoviridae.

**Tableau V** : Nombre de bases assignées aux virus détectés dans les échantillons 1 et 2 avec des profondeurs de séquençage de 5 millions et 200 millions de reads

		Echantillon 1 ( <i>Ur. nigromaculata</i> ) †		Echantillon 2 (Lot mixte *) ‡	
		5 millions de reads	200 millions de reads	5 millions de reads	200 millions de reads
<b>Rhabdoviridae</b>	<i>Kamese-like virus</i>	0	0	3033	488705
	<i>Culex Rhabdovirus</i>	290	250508	0	0
<b>Flaviviridae</b>	<i>Yaounde-like virus</i>	429	59906	0	0
<b>Adenoviridae</b>	<i>Mastadenovirus C</i>	0	298	0	0
<b>Nodaviridae</b>	<i>Insect Alphadonavirus</i>	0	286	0	292
<b>Dicistroviridae</b>	<i>Insect Cripavirus</i>	0	536	0	876
<b>Non classés</b>	<i>Plant Tenuivirus</i>	0	4596	0	0

\* *Ur. bilineata*, *Ur. caliginosa*, *Ur. machadoi*, *Ur. chorleyi*, *Ur. alboabdominalis*, *Ur. caeruleocephala*, *Er. grahami*, *Ur. Chrysogaster*, *Lu. tigries*, *Mi. plumosa*

† Diptères collectés à Kessipoughou ; ‡ Diptères collectés à Djibilong

### *Criblage bactérien*

L'analyse des données de séquençage des 16 lots de diptères, a permis de détecter plusieurs séquences bactériennes (369 220 reads). Un grand nombre d'entre-elles correspond à des bactéries non pathogènes et des bactéries ayant un potentiel pathogène avéré chez les vertébrés ou chez les arthropodes. Ainsi les bactéries détectées étaient principalement (90% des reads, Tableau VI) des bactéries appartenant aux classes des Alphaproteobacteria (161 693 reads, 43,8%), Gammaproteobacteria (66 794 reads, 18,1%), Betaproteobacteria (56 848 reads, 15,9%) et Bacilli (41 129 reads, 11,13%).

**Table VI** : Classes bactériennes identifiées chez l'ensemble des diptères cavernicoles étudiés

Classes de bactéries	Nombre de reads	Pourcentage
Alphaproteobacteria	161693	43,8
Gammaproteobacteria	66794	18,1
Betaproteobacteria	58648	15,9
Bacilli	41129	11,1
Opitutae	15176	4,1
Actinobacteria	11119	3,0
Clostridia	4422	1,2
Cytophagia	3704	1,0
Verrucomicrobiae	2343	0,6
Autres *	4192	1,1

\* : Les autres classes de bactéries comprennent les Deinococci, Coriobacteriia, Flavobacteriia, Spirochaetes, Mollicutes, Deltaproteobacteria, Cyanophyceae, Planctomycetia, Epsilonproteobacteria, Oscillatoriothycideae, Tenericutes, Cyanobacteria, Bacteroidia, Negativicutes, Nitrospirae, Bacteroidetes, Chitinophagia, Flavobacteria, Deferribacteres, Acidobacteria, Chlamydiae, Thermotogae, Chrysiogenetes, Chthonomonadetes, Sphingobacteriia, Fusobacteria, Sphaerobacteridae, Thermodesulfobacteria, Chlorobia, Verrucomicrobia, Aquificae, Tissierellia, Acidimicrobiia, Erysipelotrichia, Phycisphaerae, Dictyoglomi, Gloeobacteria, Solibacteres, Thermomicrobia, Acidobacteriia, Blastocatellia, Caldilineae, Elusimicrobia, Ignavibacteria et Thermoleophilia

Sur un total de 161 693 reads d'Alphaproteobacteria, 156 870 (97,02%) étaient associés au genre *Wolbachia*, tandis que près de la moitié des reads restant était associée aux genres *Ehrlichia* (665 reads, 0,41%), *Bartonella* (586 reads, 0,36%), *Brucella* (406 reads, 0,25%), *Anaplasma* (387 reads, 0,24%) et *Rickettsia* (140 reads, 0,09%) dont certaines espèces sont connues pour être transmises à des vertébrés par l'intermédiaire d'arthropodes vecteurs (Seitz, 2008).

Les Gammaproteobacteria, représentant un total de 66 794 reads, étaient dominées par plusieurs genres de bactéries, dont les genres *Escherichia* (6 667 reads, 9,98%), *Acinetobacter* (5 859 reads, 8,77%), *Enterobacter* (5 461 reads, 8,18%) étaient les plus représentées. Cependant nous avons dénombré plusieurs reads associés aux genres *Yersinia* (2 740 reads, 4,1%), *Francisella* (36 reads, 0,05%) et *Coxiella* (10 reads, 0,01%), qui comprend de nombreuses espèces transmises par des arthropodes vecteurs.

Sur l'ensemble des 58 648 reads identifiées comme Betaproteobacteria, 53 956 (92%) étaient associés au genre *Neisseria*, tandis que les reads restant s'identifiaient

en majorité aux genres *Burkholderia* (1 968 reads, 3,36%), *Variovorax* (945 reads, 1,61%), et *Acidovorax* (313 reads, 0,53%).

En revanche chez les Bacilli, la majorité des reads identifiés correspondait principalement aux genres *Staphylococcus* (3 0653 reads, 74,5%), et le reste, aux genres *Bacillus* (3 597 reads, 8,7%), *Lactococcus* (1 936 reads, 4,7%) et *Streptococcus* (1 753 reads, 4,3%) principalement. Plusieurs de ces bactéries identifiées sont reconnues pour leur importance en santé humaine et animale, et leur caractère zoonotique (Herbeuval, 2002; Seitz, 2008). En plus des ces dernières, nous avons identifié 100 et 27 reads associés respectivement aux genres *Mycoplasma* (classe des Tenericutes) et *Borrelia* (classe des Spirochaetes), connus pour leur importance en santé médico-vétérinaire.

Nos résultats montrent que la majorité des genres bactériens mis en évidence a été détectée chez tous les groupes de diptères en proportions variables, à l'exception de *Borrelia*, que nous avons retrouvés uniquement chez les *Culicoides* du groupe *trifasciellus*. Cependant dans la suite de notre travail, nous nous sommes intéressés particulièrement aux bactéries présentant une importance médico-vétérinaire potentielle, à l'instar des arbobactéries (bactéries transmises par des arthropodes vecteurs), ou à des bactéries ayant été retrouvées en proportions élevées chez les diptères criblés, comme c'est le cas de certaines bactéries endosymbiotiques.

Le tableau VII résume le nombre total de reads, correspondant aux principales bactéries mises en évidence, ainsi que le nombre total de spécimens d'insectes criblés. L'analyse des communautés bactériennes en fonction des espèces de diptères suggère que le nombre de reads chez la grande majorité des bactéries a significativement varié d'une espèce de diptères à une autre. En effet, le nombre de reads d'Alphaproteobacteria détecté par spécimen de diptère s'est avéré plus élevé chez *Ph. rodhaini* et chez les *Culicoides* du groupe *trifasciellus* que chez les autres espèces de

diptères (Figure 35a ;  $\chi^2 = 1059,1$  ;  $ddl = 8$  ;  $p < 0,001$ ). Concernant les Gammaproteobacteria, le nombre de reads était plus élevé chez *Lu. tigripes*, *Culex* du



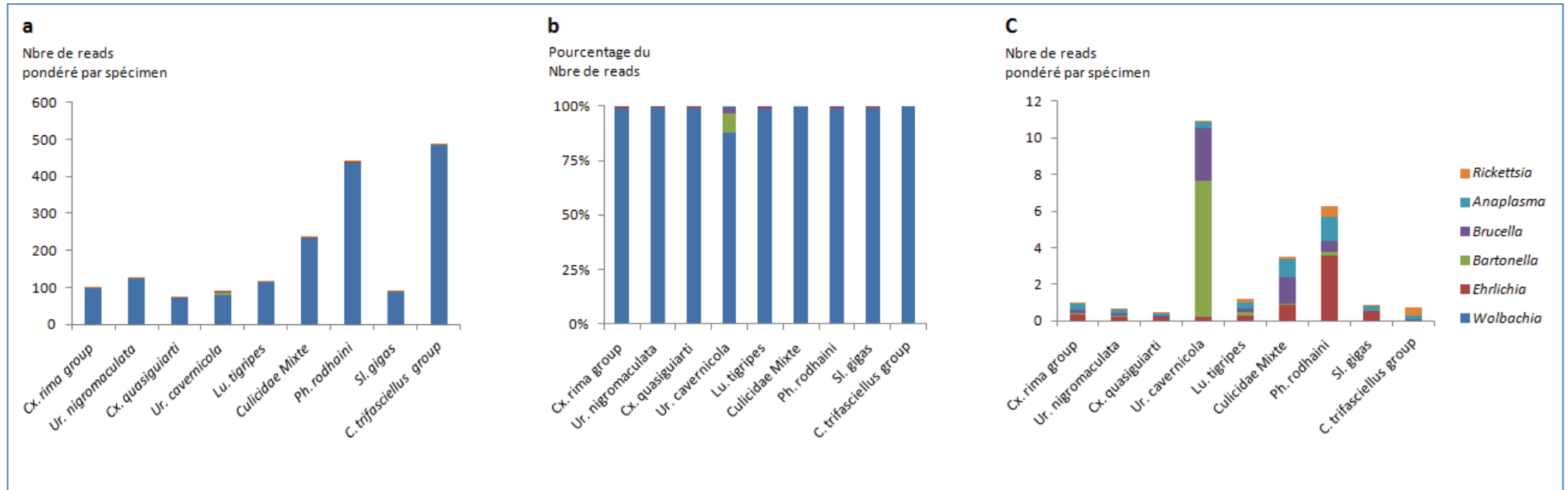


Figure 35 : Distribution des reads d'Alphaproteobacteria détectés chez les diptères analysés

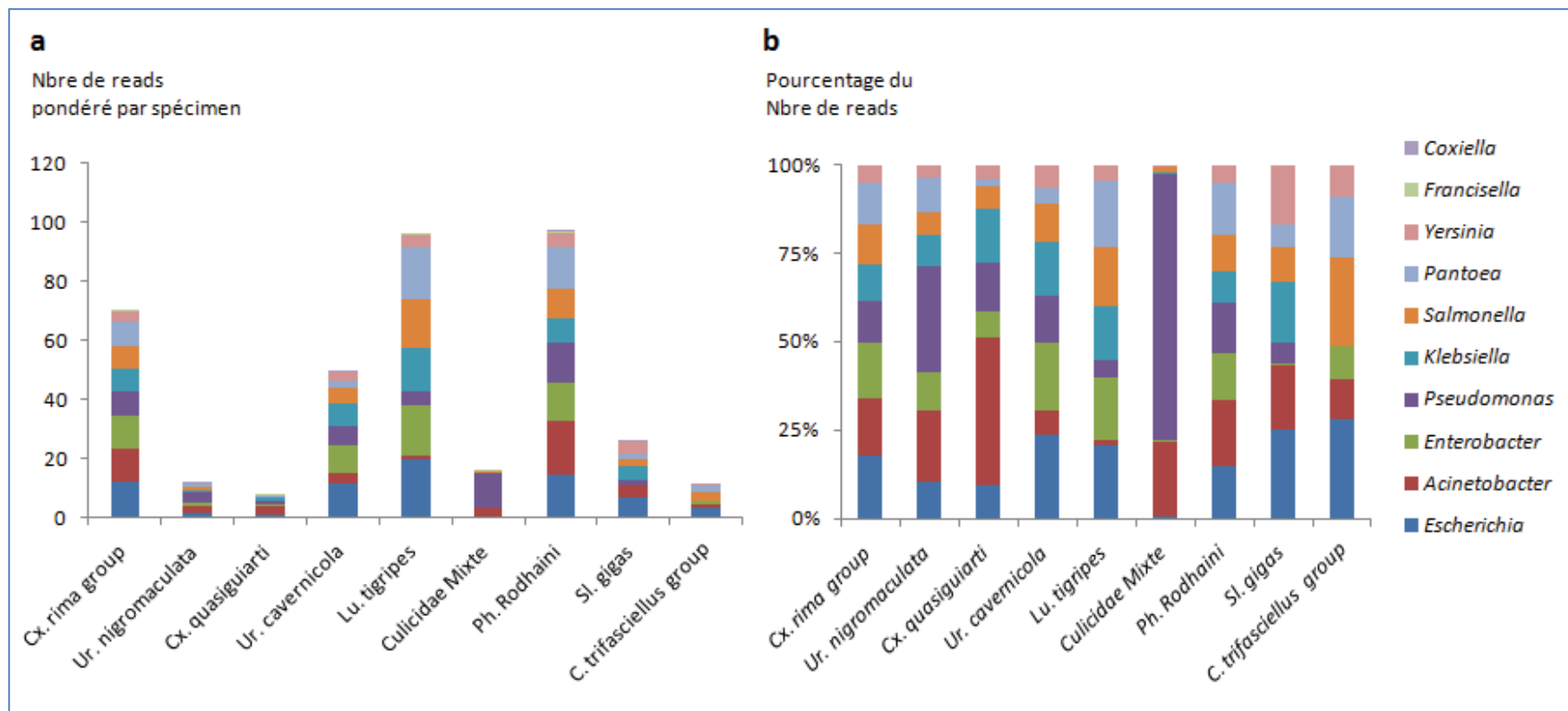


Figure 36 : Distribution des reads des Gammaproteobacteria détectés chez les diptères analysés

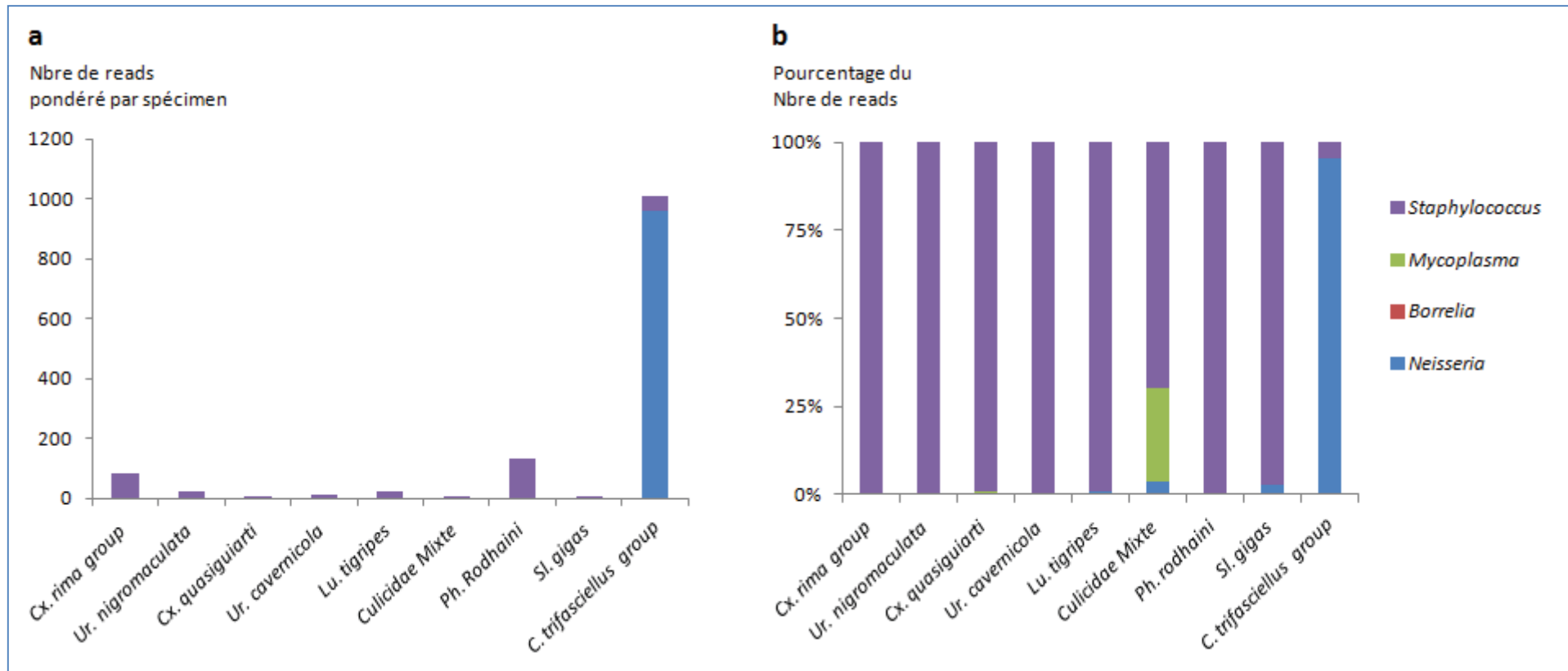


Figure 37 : Distribution des reads des Betaproteobacteria, Spirochaetes, Tenericutes et Bacilli détectés chez les diptères analysés

groupe *rima* et *Ph. rodhaini* que chez les autres espèces de diptères (Figure 36a ;  $\chi^2 = 252,5$  ;  $ddl = 8$  ;  $p < 0,001$ ). En revanche le nombre de reads associés à *Neisseria* était plus élevé respectivement chez les *Culicoides* du groupe *trifasciellus* que chez les autres espèces de diptères ( $\chi^2 = 7676,8$  ;  $ddl = 8$  ;  $p < 0,001$ ), tandis que le nombre de reads de *Staphylococcus* ( $\chi^2 = 419,7$  ;  $ddl = 8$  ;  $p < 0,001$ ) était plus élevé chez *Ph. rodhaini* et *Culex* du groupe *rima* que chez d'autres espèces de diptères (Figure 37a).

Nos données montrent que pour l'ensemble des espèces de diptères, les Alphaproteobacteria détectées sont largement dominées par les *Wolbachia* (Figure 35b). Cependant une représentation de ces bactéries sans les *Wolbachia* a permis de mieux apprécier l'abondance des reads correspondant aux autres genres d'Alphaproteobacteria (Figure 35c). En revanche chez les Gammaproteobacteria, les principales bactéries détectées étaient présentes en proportions similaires chez l'ensemble des espèces de diptères, à l'exception du lot mixte de moustiques, pour lequel nous avons détecté une majorité de *Pseudomonas* (Figure 36b). En revanche les autres classes bactériennes, Betaproteobacteria, Spirochaetes, Tenericutes et Bacilli n'étaient principalement dominées que par les genres *Neisseria*, *Borrelia*, *Mycoplasma* et *Staphylococcus* respectivement (Figure 37b).

**Tableau VII** : Principaux genres bactériens détectés chez les diptères cavernicoles criblés

	<i>Cx. rima</i> group (124)	<i>Ur. nigromaculata</i> (161)	<i>Cx. quasiguiarti</i> (148)	<i>Ur. cavernicola</i> (74)	<i>Lu. tigripes</i> (23)	Culicidae Mixtes (52)	<i>Ph. Rodhaini</i> (88)	<i>Sl. gigas</i> (324)	<i>C. trifasciellus</i> group (56)
<b>Alphaproteobacteria</b>									
<i>Wolbachia</i>	12103	19927	10599	5765	2628	12049	38285	28270	27244
<i>Ehrlichia</i>	47	32	28	16	7	46	316	172	1
<i>Bartonella</i>	3	8	1	549	4	4	15	1	1
<i>Brucella</i>	23	24	11	213	5	73	53	0	4
<i>Anaplasma</i>	41	31	22	25	7	54	115	83	9
<i>Rickettsia</i>	9	9	2	8	4	6	50	25	27
<b>Betaproteobacteria</b>									
<i>Neisseria</i>	36	3	6	3	4	7	54	11	53832
<b>Gammaproteobacteria</b>									
<i>Escherichia</i>	1520	191	100	869	456	5	1254	2090	182
<i>Acinetobacter</i>	1399	378	458	241	29	170	1599	1510	75
<i>Enterobacter</i>	1376	205	79	705	394	1	1147	5	61
<i>Pseudomonas</i>	1029	570	152	474	106	604	1211	508	0
<i>Klebsiella</i>	892	162	165	562	335	5	736	1432	0
<i>Salmonella</i>	963	124	68	404	378	12	882	819	163
<i>Pantoea</i>	1023	177	21	157	412	0	1260	522	111
<i>Yersinia</i>	433	72	46	236	97	2	408	1387	59
<i>Francisella</i>	5	0	1	2	1	2	20	5	0
<i>Coxiella</i>	0	1	0	2	0	0	6	1	0
<b>Bacilli</b>									
<i>Staphylococcus</i>	10138	3430	932	1022	499	142	11461	405	2624
<b>Spirochaetes</b>									
<i>Borrelia</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	26
<b>Tenericutes</b>									
<i>Mycoplasma</i>	0	1	1	1	0	54	1	1	41
<b>Total des reads</b>	31040	25346	12692	11254	5366	13236	58873	37247	84460

Entre parenthèse : le nombre de spécimens criblés par espèce ou groupe d'espèces de diptères

## 7.4. Discussion

### *Criblage viral*

L'approche transcriptomique que nous avons utilisé a permis de détecter chez les diptères analysés la présence de virus appartenant à un large spectre de familles virales. La majorité des séquences correspondant à des virus de vertébrés que nous avons détectées chez des phlébotomes (*Sl. gigas* et *Ph. rodhaini*), des cératopogonides (*Culicoides* du groupe *trifasciellus*), et plusieurs espèces de moustiques (à l'exemple de *Culex* du groupe *rima*, *Cx. quasiguiarti*, *Ur. nigromaculata*, *Ur. cavernicola*) correspondait principalement à des Rhabdoviridae. Ces résultats suggèrent que cette famille est la plus représentées chez ces trois groupes de diptères dans les grottes Kessipoughou et de Djibilong. Les Rhabdoviridae sont des virus infectant un large panel d'hôtes comprenant les arthropodes, les mammifères, dont l'homme et divers animaux sauvages et domestiques (Pringle, 1977). Ces virus peuvent être à l'origine d'états pathologiques graves chez les animaux et les humains, à l'exemple du virus de la rage, pouvant causer des syndromes neurologiques, du virus Chandipura, pouvant être responsable de syndromes fébriles ou encéphalitiques (Bhatt and Rodrigues, 1967; Shope, 1982), ou encore du virus Bas-Congo, responsable de syndromes hémorragiques chez l'homme (Grard et al., 2012a). Dans les milieux cavernicoles, les chauves-souris sont des hôtes réservoirs privilégiés de Rhabdoviridae hautement zoonotiques (Kuzmin et al., 2008a; Kuzmin et al., 2008b), et occupent une place de choix parmi les hôtes nourriciers des diptères hématophages cavernicoles (Adam, 1965b; Vattier-Bernard, 1970b). Des études ont montré que la transmission d'un grand nombre de Rhabdoviridae peut s'effectuer suivant un mode vectoriel par des arthropodes hématophages (Comer and Tesh, 1991). En Asie, la compétence vectorielle des espèces de moustiques *Stegomyia aegypti*, *St. albopicta*, *Anopheles*

*stephensi* et *Culex tritaeniorhyncus* vis-à-vis du virus Chandipura (genre *Vesiculovirus*) a été expérimentalement démontrée (Ramachandra Rao et al., 1967). Une transmission expérimentale de ce Rhabdoviridae a également été réalisée avec succès chez le phlébotome *Phlebotomus argentipes* (Mavale et al., 2007). En conditions naturelles, le virus Chandipura a été isolé chez des phlébotomes des genres *Phlebotomus* et *Sergentomyia* en Asie (Dhanda et al., 1970; Geevarghese et al., 2005). Un virus qui lui est proche a été isolé en Afrique (Ba et al., 1999; Fontenille et al., 1994). C'est également le cas pour du virus Perinet, appartenant également au genre *Vesiculovirus*, qui a été isolé de *Sergentomyia* à Madagascar (Clerc et al., 1982). Plusieurs études ont montré l'implication des cératopogonides, en particulier ceux du genre *Culicoides*, dans la transmission de certains Rhabdoviridae. C'est le cas du virus de la stomatite vésiculaire de New Jersey, infectant les porcins et les bovins, dont le vecteur est un *Culicoides* (De Leon et al., 2006; De Leon and Tabachnick, 2006). C'est également le cas pour le virus de la fièvre éphémère bovine (BEFV pour *Bovine Ephemeral Fever Virus*), infectant les ruminants et dont les principaux vecteurs sont des *Culicoides* (Mellor et al., 2000). Un cératopogonide du genre *Culicoides* est également soupçonné d'être le vecteur d'un *Ephemerovirus* du groupe Tibrogargan (Kuzmin et al., 2009). Cependant, le rôle des *Culicoides* dans l'épidémiologie des Rhabdoviridae d'animaux cavernicoles, en particulier des chauves-souris, est encore mal connu. Ainsi, bien que nos résultats ne permettent pas d'exclure que ces Rhabdoviridae puissent être spécifiques de ces diptères, circulant *via* une transmission transovarienne ou vénérienne comme cela a déjà été démontré pour les moustiques et les phlébotomes (Mavale et al., 2006; Tesh and Modi, 1983), on ne peut écarter la possibilité que les moustiques, les phlébotomes et les cératopogonides soient impliqués dans leur circulation dans les grottes de Kessipoughou et Djibilong.



Le criblage réalisé avec une profondeur de séquençage de 200 millions de reads nous a permis de confirmer la présence du virus Kamese ou d'un virus *Kamese-like* potentiellement nouveau chez des moustiques (lot mixte) de la grotte de Djibilong. Le virus Kamese a été isolé pour la première fois en Uganda chez l'espèce de moustique *Cx. annulioris* (Henderson et al., 1967). Depuis lors, il a également été isolé chez d'autres espèces de moustiques telles qu'*Aedes africanus*, *Lutzia tigris* (Boussès et al., 2013; Dacheux et al., 2010; Monath et al., 1979). Bien qu'il ait été suspecté de circuler chez des vertébrés (Walker et al., 2015), le virus Kamese n'a pour l'heure jamais été isolé de ces derniers. Il est difficile cependant de conclure sur sa capacité à infecter des vertébrés, car l'absence d'isolement peut également être imputable aux difficultés d'isoler certains Rhabdoviridae avec des techniques conventionnelles (Mellor et al., 2000) ; au manque d'outils moléculaires permettant leur détection ; ou encore au faible effort de criblage de ces virus dans les vertébrés sauvages. Ce virus est phylogénétiquement classé parmi les virus du super-groupe des Dimarhabdovirus, c'est-à-dire, des rhabdovirus circulant à la fois chez les diptères et les mammifères. Ainsi le virus Kamese est proche d'un certain nombre de Rhabdovirus qui infectent naturellement les mammifères et qui peuvent être pour la plupart responsables de pathologies chez l'homme, à l'exemple du virus Bas-Congo (BASV) (Grard et al., 2012a; Steffen and Simmons, 2014) ; ou les animaux domestiques et sauvages (Dacheux et al., 2010; Huang et al., 2016; Walker et al., 2015; Whitney, 1964). Le fait d'avoir retrouvé ce virus ou un nouveau virus qui lui est proche parmi les diptères que nous avons collectés montre que ce dernier circule bel et bien dans les milieux cavernicoles d'Afrique Centrale. Il est possible que les mammifères cavernicoles, et en particulier les chauves-souris, soient impliqués dans l'épidémiologie de ce virus, comme c'est le cas pour certains *Lyssavirus*, *Ledantevirus* ou *Vesiculovirus* (Walker et al., 2015). Nos observations confirment que les

moustiques pourraient dans ce cas être des candidats vecteurs naturels de ce virus. En dehors des moustiques des genres *Culex* ou *Anopheles*, le plus souvent impliqués dans la transmission des virus de mammifères, un intérêt particulier devrait être porté sur les moustiques des genres *Uranotaenia*, *Eretmapodites*, *Mimomyia*, ou *Lutzia*, susceptibles d'être également impliqués dans l'épidémiologie de ce virus. Des analyses génétiques plus approfondies permettraient de mieux caractériser ce virus.

Nous avons détecté des séquences de Flaviviridae dans un lot d'*Ur. nigromaculata* (grotte de Kessipoughou) et un autre lot de *Lu. tigrupes* (grotte de Djibilong). Les Flaviviridae appartiennent au groupe des virus transmis par des arthropodes. Certains de ces virus infectent plusieurs hôtes vertébrés et sont responsables d'épidémies et d'épizooties à travers le monde, à l'instar des virus de la Dengue (DENV), du *West Nile* (WNV), ou de l'encéphalite japonaise (JEV pour *Japanese Encephalitis Virus*) (Guzman and Kouri, 2002; Hayes et al., 2005; Mackenzie et al., 2004). Par contre d'autres virus ne sont connus à ce jour que des arthropodes. A l'exception des tiques, les moustiques constituent les principaux hôtes et vecteurs des Flaviviridae (Crabtree et al., 2003; Hoshino et al., 2007). Les Flaviviridae ont rarement été mis en évidence chez les espèces des genres *Uranotaenia* et *Lutzia*. L'un des rares cas d'isolement réussi de Flaviviridae concerne le virus Nounané qui a été isolé chez *Uranotaenia mashaensis*, à partir d'individus collectés dans un milieu forestier d'Afrique (Junglen et al., 2009). A ce jour, des infections de moustiques du genre *Lutzia* par des Flaviviridae n'ont jamais été rapportées. L'implication des *Uranotaenia* et des *Lutzia* dans la circulation d'arbovirus en général, et des Flaviviridae en particulier a été peu investiguée, certainement du au fait qu'ils ne sont pas considérés comme des moustiques présentant un intérêt médical et vétérinaire.

L'épidémiologie des Flaviviridae se caractérise par l'existence d'arthropodes jouant le rôle de vecteurs, mais aussi d'animaux vertébrés pouvant être des réservoirs naturels ou des hôtes intermédiaires servant d'amplificateurs naturels de virus (Van Der Poel et al., 2006). A ce jour, les Flaviviridae ont été investigués chez un très grand nombre d'animaux vertébrés en milieu sauvage permettant de nombreux isollements chez des oiseaux et des mammifères (Wong et al., 2006). Cependant le potentiel de réservoirs de Flaviviridae des vertébrés cavernicoles demeure encore mal connu. Toutefois, certaines études ont montré des infections chez plusieurs espèces de chauves-souris (Cross, 1971; Herbold et al., 1983; Platt et al., 2000) permettant ainsi de spéculer sur leur capacité à héberger naturellement ces virus. Parmi ces dernières, les roussettes (*Rousettus* spp.), les minioptères (*Miniopterus* spp.) et les hipposidérides (*Hipposideros* spp.) ont le plus souvent été retrouvées infectées (Platt et al., 2000; Zhang et al., 1998). Un grand nombre de ces espèces colonisent divers milieux cavernicoles à travers le monde (ACR, 2014; Nowak, 1994), et en particulier en Afrique Centrale, parmi lesquels figurent les grottes de Kessipoughou et de Djibilong (Obame-Nkoghe et al., 2016). Plusieurs investigations menées chez divers espèces de chauves-souris cavernicoles ont permis de mettre en évidence la circulation de *Flavivirus* dont les espèces n'ont pas été déterminées chez ces dernières, en particulier chez les espèces *Rousettus aegyptiacus* ou *Hipposideros gigas* (Maganga et al., 2014b). En revanche, si ces virus sont bien des arbovirus, leurs vecteurs demeurent encore inconnus. Bien que nos données ne nous permettent pas d'identifier au niveau spécifique les Flaviviridae retrouvés chez des moustiques que nous avons analysés, elles nous permettent d'envisager l'implication de ces derniers dans leur circulation au sein des grottes de Kessipoughou et Djibilong.

Le criblage réalisé avec une profondeur de 200 millions de reads nous a permis de mettre en évidence un proche variant du virus Yaoundé dans un lot de spécimens

d'*Ur. nigromaculata* collectés dans la grotte de Kessipoughou. Le virus Yaoundé est un *Flavivirus* relativement rare, très proche d'autres *Flavivirus* d'importance médicale et vétérinaire comme le virus de l'encéphalite japonaise et le virus West Nile (Williams et al., 2011). Avant cette étude il n'était connu que de quelques espèces d'oiseaux, de rongeurs et de moustiques d'Afrique tropicale (Adam and Digoutte, 2005; Williams et al., 2011). Notre étude suggère pour la première fois qu'un potentiel nouveau variant de ce virus pourrait circuler 1) au Gabon et 2) dans des écosystèmes cavernicoles, et 3) que l'espèce *Ur. nigromaculata* pourrait servir de vecteur. Des études génétiques ainsi que des investigations plus approfondies chez les moustiques, éventuellement les phlébotomes et les cératopogonides, et les potentiels hôtes réservoirs de ce virus dans les milieux cavernicoles et environnants permettraient de mieux caractériser et comprendre l'écologie de ce virus Yaoundé-like.

De façon surprenante, nous avons détecté une séquence de Coronaviridae dans un unique lot de spécimens de *Culex* du groupe *rima* collectés dans la grotte de Kessipoughou, et dans un lot de *Ph. rhodaini* collectés à la grotte de Djibilong. La circulation potentielle des Coronaviridae chez les arthropodes en conditions naturelles est un phénomène non encore démontré. Cependant, une étude a rapporté l'isolement d'un virus morphologiquement semblable aux *Coronavirus*, sans pour autant fournir des données génétiques, chez des tiques « non gorgées » d'oiseaux collectées sous des rochers en Norvège (Traavik et al., 1977). Des études ont montré que les chauves-souris étaient parmi les principaux réservoirs de ces virus, y compris les espèces colonisant les milieux cavernicoles, comme les roussettes par exemple (Li et al., 2005). En revanche peu d'études se sont intéressées au rôle potentiel des arthropodes dans l'épidémiologie des Coronaviridae. En effet, les cas connus de transmission, par exemple chez l'homme, du Coronavirus responsable du Syndrome Respiratoire Aigu Sévère (SARS-CoV) l'ont été suite à une exposition directe aux animaux sauvages ou

domestiques infectés ayant servi d'hôtes intermédiaires d'amplification du virus, ou encore à une transmission interhumaine ne nécessitant en rien l'intervention d'arthropodes vecteurs (Guan et al., 2003). Le rôle de moustiques dans la transmission mécanique de virus à syndromes respiratoires, comme le Virus du Syndrome Respiratoire et Reproducteur Porcin (PRRSV, *Porcin Reproductive and Respiratory Syndrome Virus*), a déjà été démontré (Otake et al., 2002). Ainsi, nos résultats suggèrent la circulation de *Coronavirus* dans les grottes. Ces virus peuvent a priori être prélevés par des moustiques et phlébotomes desquels nous les avons détectés. A ce stade, il est difficile de dire si ces arthropodes peuvent jouer un rôle dans leur transmission mécanique ou biologique. En effet la seule détection d'un virus dans un arthropode ne démontre en rien un rôle de cet arthropode comme vecteur. Des recherches plus approfondies seront nécessaires.

Nous avons mis en évidence deux séquences virales correspondant à un virus Adenoviridae chez un lot de moustiques de l'espèce *Ur. nigromaculata* collectés dans la grotte de Kessipoughou. Les Adenoviridae infectent les mammifères, chez qui ils sont responsables de diverses infections respiratoires et gastro-intestinales (Gál et al., 2013) y compris chez l'homme (Larranaga et al., 2000; Phan et al., 2005). Des études ont montré que les chauves-souris, y compris les espèces cavernicoles, figuraient parmi les nombreux hôtes de ces virus à travers le monde (Jánoska et al., 2011; Raut et al., 2012; Shi, 2010), en Afrique en particulier (Conrardy et al., 2014). Au Gabon, ces virus circulent chez l'homme et la faune vertébrée sauvage (Lekana-Douki et al., 2015; Nkogue et al., 2016; Wevers et al., 2010). En revanche, c'est la première fois que nous rapportons la présence d'Adenoviridae chez des moustiques en Afrique centrale. A l'instar des Coronaviridae, la circulation des Adenoviridae chez les arthropodes est un phénomène peu connu. Ces virus infectent les mammifères principalement par voie oro-fécale ou aérienne d'un hôte à un autre. Cependant des

essais fructueux d'isolement d'Adenoviridae sur lignée cellulaire ont montré leur capacité à infecter des cellules d'insectes (Shortridge et al., 1972). A ce stade, nos résultats, ne permettent pas de conclure à un rôle actif des moustiques dans la transmission des Adenoviridae. Ils permettent néanmoins d'envisager une implication potentielle de ces diptères dans leur l'épidémiologie en milieux naturel.

Dans l'ensemble des lots de diptères criblés, nous avons identifié un grand nombre de séquences associées à des virus d'insectes, comprenant les familles Dicistroviridae, Alphatetraviridae, Mesoniviridae. Il est démontré que les arthropodes, en particulier les insectes, hébergent une multitude de virus qui leurs sont spécifiques et dont la circulation est assurée par une transmission transovarienne ou par une transmission vénérienne (D'Arcy et al., 1981; Gomariz-Zilber and Thomas-Orillard, 1993; Hatfill et al., 1990). La transmission peut également être environnementale, notamment par le relargage des virus chez certaines formes larvaires dans les gîtes de reproduction, ou assurée par cannibalisme de certaines larves d'arthropodes (Chapman et al., 1999; Grunmill and Boots, 2016). Ces virus peuvent toutefois être pathogènes pour les insectes, comme par exemple certains Dicistroviridae qui peuvent induire des perturbation physiologiques induisant une baisse de la longévité et la fécondité des insectes infectés (Bonning, 2009). Les Alphatetraviridae et Mesoniviridae sont des familles virales récemment décrites, et qui restent encore peu documentées, notamment en ce qui concerne la pathogénèse chez les arthropodes. Cependant, des études récentes ont montré que certains Mesoniviridae, à l'exemple du Cavally virus, peuvent induire des effets cytopathologiques sur des lignées cellulaire C6/36 du moustique *Stegomyia albopicta* (Zirkel et al., 2013).

Nous avons identifié également des virus de plantes appartenant aux familles des Luteoviridae, Potyviridae, Virgaviridae et au genre *Sobemobirus* (non assigné à une famille). La présence de ces virus chez des moustiques, phlébotomes et

cératopogonides, bien que surprenante à première vue, peut s'expliquer car ces groupes peuvent ingérer des végétaux contenant des virus soit à l'état larvaire, soit à l'état adulte lors du prélèvement de nectars de plantes contaminées dans l'environnement proche des grottes (Ofori and Francki, 1985; Van Munster et al., 2005). Bien que certains de ces virus, par exemple des genres *Polerovirus* (Luteoviridae) ou des *Potyvirus* (Potyviridae) peuvent être transmis chez les plantes par certains insectes hémiptères (Atreya et al., 1991; Yang et al., 2008), peu d'informations permettent de statuer sur le rôle des diptères hématophages dans la transmission de ces virus chez les plantes.

En définitive, l'exploration de la diversité virale circulant chez les diptères hématophages cavernicoles de Kessipoughou et Djibilong nous a permis de détecter plusieurs familles de virus. Bien que les données recueillies ne nous aient pas permis de caractériser les virus à une échelle spécifique, elles nous renseignent toutefois sur la grande diversité de virus hébergés et potentiellement transmis par les diptères hématophages cavernicoles de Kessipoughou et Djibilong. Le fait d'avoir identifié ces virus chez plusieurs espèces de diptères troglodytes (espèces colonisant à la fois les environnements cavernicoles et les environnements hypogés) suscite davantage d'intérêt dans la mesure où ces espèces pourraient assurer des transferts de ces virus entre les grottes et les milieux anthropisés environnants, comme c'est le cas pour la grotte de Djibilong située dans le périmètre d'un ranch habité. Des analyses supplémentaires sont actuellement en cours. Elles consistent à développer des outils de PCR permettant des analyses phylogénétiques complémentaires et à réaliser des tentatives d'isollements des différents virus trouvés afin de mieux les caractériser.

### ***Criblage bactérien***

Au cours de notre étude nous avons procédé à la description du bactériome associé à différentes espèces de diptères hématophages collectés dans les grottes de



Kessipoughou et de Djibilong. Ces bactéries colonisent, comme endosymbiontes ou pathogènes un grand nombre d'organismes, y compris les arthropodes (Gao et al., 2009; Williams et al., 2007). A l'exception des bactéries des genres *Neisseria* et *Borrelia* qui ont été presque essentiellement retrouvées chez les *Culicoides* du groupe *trifasciellus*, l'homogénéité globale des communautés bactériennes que nous avons observée chez l'ensemble des diptères suggère que ces bactéries sont peu opportunistes et semblent avoir été plutôt positivement sélectionnées par ces derniers, comme cela est suggéré chez d'autres arthropodes (Wilkinson et al., 2016). Nous avons observé que les communautés bactériennes étaient principalement dominées par les Alphaproteobacteria du genre *Wolbachia* chez l'ensemble des espèces de diptères. Cela suggère que les *Wolbachia* semblent s'être plus stablement adaptées chez ces derniers. En effet, ces bactéries endosymbiotiques, connues pour influencer la biologie reproductive ainsi que la circulation de divers agents infectieux chez des arthropodes infectés, sont en général largement répandues chez les diptères, y compris les moustiques, les phlébotomes et les cératopogonides (Duron et al., 2006; Lewis et al., 2014; Ono et al., 2001). Bien que ces bactéries peuvent être transmises horizontalement par des interactions intra ou interspécifiques, (Ono et al., 2001), leur forte dominance dans les communautés bactériennes pourrait plutôt être le résultat d'une transmission verticale, connue pour être le principal mode de diffusion des *Wolbachia* chez les arthropodes (Werren et al., 2008). En revanche, la différence observée de l'abondance des reads de *Wolbachia* en fonction des espèces de diptères pourrait laisser penser que la force de sélection ou le degré d'adaptation de ces bactéries peut varier d'une espèce à une autre, leur permettant de se multiplier plus ou moins rapidement en fonction des espèces de diptères. Ces différences pourraient toutefois être associées à l'existence de souches différentes de *Wolbachia* infectant les espèces de diptères, ou être liées directement aux espèces de diptères. Dans notre

étude, la presque totalité des reads associés aux *Neisseria* a été détectée chez les *Culicoides* du genre *trifasciellus*. Ces bactéries infectent un grand nombre de mammifères, y compris l'homme chez lequel certaines espèces peuvent causer des maladies telles que les méningites (Caugant, 1998; Tzeng and Stephens, 2000). Ces bactéries, bien que peu documentées chez les diptères, ont toute fois été rapportés chez des moustique du genre *Anopheles* (Gendrin and Christophides, 2013), et certains hyménoptères (Cox-Foster et al., 2007). Nos résultats semblent indiquer une association préférentielle entre les *Culicoides* du groupe *trifasciellus* et *Neisseria*, et suggèrent ainsi que la présence de ces endosymbiontes chez les diptères des grottes de Kessipoughou et Djibilong est dépendante des espèces.

Contrairement à ce que nous avons observé chez les Alphaproteobacteria et les *Neisseria*, les *Staphylococcus* ainsi que l'ensemble des Gammaproteobacteria, en dehors des *Francisella* et *Coxiella*, ont été détectés en proportions similaires et homogènes chez l'ensemble des diptères. La distribution homogène de ces bactéries chez l'ensemble des espèces de diptères suggère que ces dernières font partie de leur microbiote permanent. Des études ont montré que ces bactéries, décrites comme des endosymbiontes intracellulaires, sont connues pour infecter naturellement une large variété d'arthropodes, y compris les moustiques, les phlébotomes et les cératopogonides (Campbell et al., 2004; Gao et al., 2009; Gendrin and Christophides, 2013; Sant'Anna et al., 2012). Contrairement à d'autres endosymbiontes comme les *Wolbachia*, à l'heure actuelle la nature des interactions de ces bactéries avec leurs hôtes arthropodes et avec d'autres microorganismes restent encore à élucider (Gao et al., 2009; Gendrin and Christophides, 2013; Wilkinson et al., 2016).

Au cours de notre étude nous avons détecté plusieurs bactéries assignées aux genres *Rickettsia*, *Anaplasma*, *Brucella*, *Bartonella*, *Yersinia*, *Francisella*, *Coxiella*, *Borrelia* et *Mycoplasma*. Ces bactéries zoonotiques infectent une grande variété

d'hôtes parmi les vertébrés, y compris l'homme et les animaux domestiques (Seitz, 2008). Ces bactéries infectent principalement les cellules sanguines et sont donc hautement transmissibles par les arthropodes hématophages. Ainsi la distribution hétérogène des reads associés à ces bactéries, et leur faible proportion au sein du microbiote des diptères criblés suggèrent, contrairement aux endosymbiontes permanents, que leur présence résulte d'infections opportunistes exogènes.

Nous avons détecté les *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Rickettsia*, *Francisella* et *Coxiella* chez l'ensemble des diptères, mais surtout en grande majorité chez les phlébotomes *Ph. rodhaini* et *Sl. gigas*. Ces bactéries sont responsables d'ehrlichioses (*Ehrlichia* spp.), d'anaplasmoses (*Anaplasma* spp.), de rickettsioses (*Rickettsia* spp.), de tularémie (*Francisella* spp.) et de coxielloses (*Coxiella* spp.) affectant les humains ou les animaux domestiques. Au Gabon ces bactéries circulent, et des cas d'infections ont été rapportés chez l'homme et/ou la faune domestique, à l'exception des *Francisella* qui demeurent encore peu investiguée (Angelakis et al., 2014; Davoust et al., 2006; Marié et al., 2009; Mourembou et al., 2015). En revanche leur circulation chez les mammifères cavernicoles reste encore à étudier. Bien que ces bactéries ont pu être rapportées chez divers groupes de diptères hématophages, les vecteurs principaux connus à ce jour sont les tiques, et certaines espèces parmi les puces et les poux (Rodhain and Perez, 1985; Seitz, 2008). Ces bactéries sont pour la plupart difficiles à isoler, comme c'est le cas pour un grand nombre d'agents infectieux bactériens (Reiman, 1993). Néanmoins, nos résultats permettent d'envisager un rôle éventuel des phlébotomes dans leur épidémiologie en milieu cavernicole.

Nous avons détecté des *Bartonella*, *Brucella*, *Yersinia* en grande majorité chez le moustique *Ur. cavernicola* et le phlébotome *Ph. rodhaini*, et *Mycoplasma* dans un lot multispécifique de moustiques. Ces bactéries sont responsables de divers états pathologiques chez les humains (à l'exemple de la maladie de Carrion) et la faune

domestique (Jacomino and Raoult, 2000; Seitz, 2008). Ces bactéries circulent au Gabon (Rolain et al., 2005), et à ce jour les tiques, les puces et les poux constituent les vecteurs primaires de ces bactéries (Bowman, 2011; Seitz, 2008). Cependant nos résultats suggèrent que, en plus des phlébotomes, les moustiques pourraient également jouer un rôle dans leur transmission.

Nos analyses nous ont permis également de détecter la présence des *Borrelia* et *Mycoplasma* chez les *Culicoides* du groupe *trifasciellus*. Ces bactéries, à l'instar d'autres arbobactéries, sont des pathogènes qui infectent une grande variété de d'hôtes mammifères, y compris l'homme et la faune domestique (Cottew and Yeats, 1982; Jansson, 1971; Parker and White, 1992; Stanek and Strle, 2003). Les vecteurs connus de ces bactéries sont les tiques (*Ixodes* sp.). Ces bactéries sont peu documentées en milieux cavernicoles, cependant nos données permettent d'envisager un possible rôle des cératopogonides dans leur épidémiologie dans ces milieux.

A travers cette étude exploratoire, la détection de plusieurs bactéries hémotropes chez les espèces de diptères retrouvés dans les grottes de Kessipoughou et Djibilong suggère que ces espèces peuvent jouer un rôle potentiellement important dans leur circulation au sein des grottes, mais aussi dans les milieux extérieurs environnants *via* les espèces de diptères troglodytes. Nos résultats montrent l'intérêt de poursuivre les recherches sur l'épidémiologie de ces bactéries en lien avec les diptères hématophages, qui peuvent se révéler être des vecteurs insoupçonnés de ces bactéries dans ces milieux et leurs environs.

En définitive, la découverte de la diversité du bactériome hébergée par les diptères hématophages des grottes de Kessipoughou et Djibilong, s'est révélée être un bonus exploratoire dans la recherche des agents infectieux circulant chez ces derniers. Bien que nos données ne nous aient pas permis de caractériser à l'échelle spécifique ces bactéries, elles nous ont permis d'identifier en revanche les genres bactériens

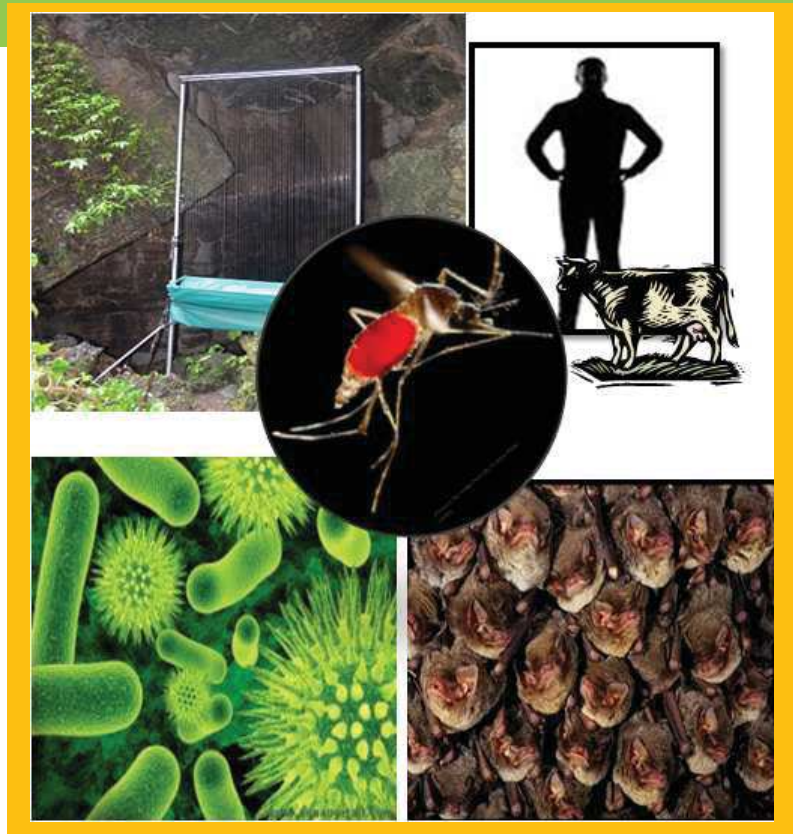
potentiellement transmis par les diptères hématophages dans les environnements cavernicoles d'Afrique centrale. Ces bactéries ont été détectées chez certaines espèces de diptères troglodites, suscitant notre attention sur le rôle clé que ces espèces pourraient jouer dans l'externalisation de ces bactéries dans les environnements anthropisés péri-cavernicoles. Des analyses supplémentaires sont en cours, notamment la conception d'outils PCR, permettant de mieux caractériser le microbiote de ces diptères, et en particulier les arbovirus qu'ils sont susceptibles de transmettre dans les grottes et les milieux environnants.



# Chapitre 8

## Discussion générale

*L'ensemble des résultats obtenus de nos travaux sont discutés et replacés dans le contexte des connaissances actuelles concernant l'exploration de la biodiversité cavernicole et l'émergence zoonotique associée aux environnements cavernicoles. Des hypothèses 1) expliquant la diversité de l'entomofaune diptérienne observée dans les grottes explorées et 2) permettant d'envisager le rôle des diptères hématophages observés dans l'épidémiologie de divers agents infectieux zoonotiques y sont formulées.*





## 8.1. Peuplement cavernicole des diptères hématophages libres du Gabon

### *Inventaire taxonomique*

Mieux comprendre et évaluer l'importance vectorielle des diptères hématophages cavernicoles exige d'avoir au préalable des connaissances de base sur leur identité et les paramètres écologiques qui les caractérisent. Avant la présente étude, les travaux exploratoires entrepris par Adam et Vattier-Bernard au Gabon dans les grottes de la forêt de Bélinga avaient permis la découverte de plusieurs diptères hématophages répartis en quatre taxons, dont les moustiques *Anopheles smithii s. l.* et *Culex* sp. ; le cératopogonide *Culicoides brosetti* ; et le phlébotome *Spelaeophlebotomus gigas* (Adam, 1966; Vattier-Bernard and Adam, 1966a). Notre étude a permis d'enrichir significativement l'inventaire taxonomique des diptères hématophages cavernicoles du Gabon, grâce à la découverte de 51 espèces de moustiques, 10 espèces de phlébotomes et 5 espèces de cératopogonides n'ayant jamais été signalées jusqu'à ce jour dans les écosystèmes cavernicoles. Au delà de l'écosystème cavernicole, notre échantillonnage a permis également d'augmenter significativement le nombre d'espèces de diptères hématophages connus au Gabon. En effet, il a permis la découverte de 30 nouvelles espèces de moustiques (représentant 57,7% des espèces de moustiques collectées et plus de 37% des espèces de moustiques actuellement connues au Gabon) ; 10 nouvelles espèces de phlébotomes, sur une base de 5 espèces connues préalablement (Rahola et al., 2013) ; et 5 nouvelles espèces de cératopogonides sur une base de 6 espèces connues préalablement (Delecolle et al., 2013).

Certaines des espèces que nous avons collectées ont déjà été rapportées dans plusieurs études en milieux cavernicoles à travers l'Afrique. Chez les moustiques, c'est le cas d'*Ur. cavernicola*, *An. smithii s. l.* et *An. faini* qui ont été rapportées dans des grottes ou des tunnels souterrains en RDC et au Cameroun (Adam, 1965a; Gillies and De Meillon, 1968; Mattingly, 1954). Chez les phlébotomes, il s'agit de *Sa. emilii*, *Sa.*

*moucheti*, *Se. balmicola*, rapportées dans quelques cavités au Congo-Brazzaville, au Cameroun ou en République Centrafricaine, ou encore de l'espèce *Sl. gigas*, largement répandue à travers le continent (Vattier-Bernard and Adam, 1969). En revanche, aucune des espèces de cératopogonides que nous avons collectées n'a encore été signalée en milieu cavernicole sur le continent.

A l'exception des espèces réputées cavernicoles, toutes les espèces que nous avons collectées sont connues des milieux épigés à travers le continent africain (Asimeng, 1992; Bsrat et al., 2015; Canute et al., 1971; Cornet, 1969; Cornet et al., 1974; Depaquit et al., 2005; Edwards, 1941; Glick, 1990; Hamon, 1963; Itoua et al., 1987a; Kan et al., 2004). Une part importante de ces espèces n'a pas encore été rapportée hors d'Afrique. Des exceptions sont toutefois à noter pour certaines espèces de moustiques, à l'exemple de *An. funestus*, *Cx. nebulosus*, *Cx. trifilatus*, *Lu. tigripes*, ou *Ur. alboabdominalis* dont les répartitions géographiques s'étendent à l'Océan Indien, l'Asie ou les Antilles (Alahmed, 2012; Brunhes, 1977). Il en est de même pour les phlébotomes et les cératopogonides, notamment *Se. africana*, qui a été rapportée au Yémen et en Jordanie, ainsi que le groupe *C. milnei*, dont la répartition géographique s'étant jusqu'à la péninsule arabe (Boorman, 1989; Daoud et al., 1989; Lane et al., 1988). Le fait d'avoir trouvé ces espèces épigées en grand nombre dans notre échantillonnage laisse supposer qu'elles ont un mode de vie troglodite ou troglophile. Toutefois, l'état actuel de nos résultats ne nous permet pas de statuer définitivement sur leur caractère troglodite, troglophile ou même troglobie. Pour cela des études complémentaires sur 1) la distribution des espèces suivant un gradient de profondeur au sein des grottes, 2) la distribution des espèces en milieu péri-cavernicole sur un rayon suffisamment grand, 3) et des prospections larvaires exhaustives à l'intérieur comme à l'extérieur des grottes contribueraient davantage à répondre à cet objectif.

### *Hétérogénéité de la diversité des diptères entre les grottes*

A ce jour, peu d'études dans le monde se sont intéressées à l'exploration de la diversité des diptères hématophages en lien avec l'influence des paramètres environnementaux dans les écosystèmes cavernicoles. L'analyse de l'accumulation des espèces au fil de notre échantillonnage a montré que l'inventaire que nous avons réalisé est représentatif de la diversité des espèces présentes dans les grottes explorées. Cependant nous avons noté des exceptions, notamment pour les moustiques de la grotte de Zadié, probablement à cause du faible nombre de spécimens collectés, et pour les moustiques de la grotte de Djibilong, où le nombre extrapolé d'espèces non observées s'est élevé à 13, soit près de 32% de la richesse spécifique. En outre les grottes qui ont présenté les plus faibles richesses spécifiques avaient également les plus fortes densités d'individus. Ceci suggère l'existence, parmi les espèces présentes, d'une minorité ayant acquis un succès adaptatif et reproductif en réponse aux conditions sélectives de l'environnement, comme l'ont précédemment suggéré d'autres auteurs (Dethier and Hubart, 2005). C'est le cas du groupe *Cx. rima* à la grotte du Faucon, de *Sl. gigas* ou du groupe *C. trifasciellus* à la grotte de Kessipoughou pour lesquels les densités d'individus sont les plus élevées.

Une analyse comparative des grottes a révélé une variation de la diversité spécifique entre ces dernières, et une faible similarité en composition d'espèces d'une grotte à une autre. Ces résultats suggèrent que les grottes présenteraient des conditions environnementales singulières reflétées par les différences observées sur leurs peuplements respectifs. Nous avons tout de même noté une exception chez les phlébotomes, qui ont présenté des indices de similarité élevés entre les grottes. En effet, durant notre échantillonnage, ce groupe peu diversifié a présenté la plus grande proportion d'espèces partagées entre les grottes. A ce jour, il est difficile d'établir des bases de comparaison avec d'autres régions d'Afrique ou du monde, car peu d'études similaires en milieux cavernicoles existent. En revanche, nos résultats diffèrent de

ceux ayant été observés en milieux épigés, en particulier chez les moustiques, où les indices de similarité entre deux sites pouvaient s'élever jusqu'à 98% témoignant de conditions environnementales très proches entre ces deux sites (Wang et al., 2015b).

### ***Dynamique temporelle et paramètres environnementaux***

Des analyses temporelles ont montré que la diversité des moustiques et des phlébotomes a présenté des variations significatives au cours du temps. Il est admis que les conditions du biotope influencent la disponibilité des ressources pour le développement et la survie des communautés. Ainsi les variations observées pourraient être une conséquence des changements temporels des conditions environnementales régnant dans les grottes. Des analyses similaires réalisées précédemment sur des modèles d'étude épigés ont abouti aux mêmes hypothèses (Ali et al., 2016). Ces variations pourraient ainsi affecter différemment la densité des espèces et résulter d'une dominance alternée de ces dernières dans le temps. Cette hypothèse se vérifie à la grotte de Kessipoughou où *Ur. nigromaculata* domine la communauté culicidienne entre Mai 2012-Mars 2013, alors que c'est *Ur. cavernicola* à qui occupe ce statut partir de Mai 2013. La même observation est faite à la grotte de Djibilong où, d'une part, *Cx. quasiguiarti* domine la communauté culicidienne entre Mai-Octobre 2012 avant de laisser la place à *Ur. nigromaculata* en Décembre 2012 puis à des *Cx.* du groupe *rima* entre Janvier et Avril 2013 ; et d'autre part pour *Sl. gigas*, qui domine la communauté phlébotomienne entre Mai-Juillet 2012 alors que *Sa. emilii* et *Ph. rodhaini* succèdent tour à tour entre Août-Avril 2013.

Dans le biotope des écosystèmes cavernicoles, l'eau constitue l'un des paramètres les plus influents sur le développement des communautés de diptères. Cette eau est principalement issue des précipitations. Ainsi, pour mieux comprendre l'influence potentielle des variations du niveau d'eau dans les grottes sur la dynamique des communautés de diptères, nous avons entrepris d'analyser l'abondance et la diversité

des diptères hématophages en lien avec les données pluviométriques au niveau des grottes de Kessipoughou et Djibilong. Nos analyses ont montré des associations significatives entre l'abondance, la diversité des espèces de diptères et la pluviométrie extérieure. Ces associations se sont révélées essentiellement négatives dans les deux grottes, sauf 1) pour les phlébotomes et les cératopogonides à Kessipoughou, où aucune association significative n'a été observée, et 2) pour les cératopogonides à Djibilong, où leur abondance a été positivement associée à la pluviométrie. Ces résultats peuvent s'expliquer par l'influence de l'eau sur la disponibilité en gîtes larvaires. En effet, à Kessipoughou les moustiques se développent principalement dans des petites collections d'eau à l'intérieur des creux de rochers distribués en bordure du cours d'eau souterrain (observation personnelle). Ainsi, durant les crues des saisons pluvieuses, ces gîtes sont inondés et lessivés, entraînant une baisse des populations. A l'inverse, durant les périodes « sèches », la baisse du niveau d'eau laisse émerger les creux de rochers formant des gîtes avec l'eau y ayant été retenue, propice au développement des espèces entraînant une hausse des populations. Nos hypothèses vont dans le même sens que celles d'autres auteurs qui ont précédemment montré que la permanence des niveaux d'inondation des gîtes larvaires sur des périodes prolongées influençait négativement la croissance des populations de diptères (Brown and Murray, 2013; Roiz et al., 2015). Contrairement aux moustiques, les stades immatures des phlébotomes et des cératopogonides se développent sur du sol meuble humide pourvu en ressources organiques (Abonnenc, 1972; Cornet, 1981). Ces gîtes ne sont pas restreints aux abords de la rivière souterraine, mais sont distribués dans l'ensemble des galeries de la grotte. La dynamique de ces diptères ne semble donc pas être directement affectée par les variations du niveau de la rivière souterraine, expliquant probablement le manque d'association observé avec la pluviométrie. A Djibilong, durant les saisons pluvieuses, la quasi-totalité du sol meuble est inondée, n'offrant que très peu de gîtes. Cependant en saisons sèches, l'eau

s'évapore considérablement, les rendant à nouveau disponibles (observation personnelle). Ceci pourrait ainsi expliquer l'association négative existant entre l'abondance, la diversité des phlébotomes et la pluviométrie au sein de cette grotte. En revanche, il se pourrait qu'une colonisation de la grotte par quelques cératopogonides venant du milieu extérieur durant les saisons pluvieuses puisse également expliquer l'association positive observée avec la pluviométrie.

## **8.2. Peuplement cavernicole des diptères ectoparasites de chauves-souris du Gabon et implication dans la transmission de *Polychromophilus melanipherus***

Par notre étude nous avons pu découvrir un grand nombre de diptères d'importance médico-vétérinaire parmi les diptères dits « libres ». Cependant les grottes sont également peuplées de nombreux insectes hématophages vivant en tant qu'ectoparasites d'animaux vertébrés. Nous nous sommes ainsi intéressés aux ectoparasites de chauves-souris, répartis en deux familles : les Nycteribiidae et les Streblidae. Ces deux familles de diptères sont restées longtemps méconnues au Gabon, avec une seule espèce, *Penicillidia fulvida* (Nycteribiidae), répertoriée avant notre étude. Notre étude a permis, en plus de cette espèce, d'identifier cinq nouvelles espèces pour le Gabon, dont deux Nycteribiidae, à savoir *Nycteribia schmidlii scotti* et *Eucampsipoda africana*, et trois Streblidae, dont *Brachytarsina allaudi* et deux espèces du groupe *Raymondia huberi*.

C'est la première fois qu'*E. africana* et l'ensemble des espèces de Streblidae que nous avons collectées sont retrouvées en Afrique centrale. Cependant *E. africana* est une espèce connue du reste de la Région Ethiopienne où elle parasite des chauves-souris frugivores, dont *Rousettus aegyptiacus* et *Eidolon helvum* (Theodor, 1967). Parmi les Nycteribiidae, seuls *N. schmidlii scotti* et *P. fulvida* ont été rapportées dans plusieurs pays de la Région Ethiopienne, y compris d'Afrique centrale (Cameroun et Congo Brazzaville), parasitant plusieurs chauves-souris parmi les genres *Miniopterus*,

*Nycteris*, *Pipistrellus*, *Eptesicus*, *Eidolon*, *Vespertilio*, *Rhinolophus* ou *Hipposideros* (Adam and Landau, 1973a-b, 1973b; Theodor, 1957, 1967). Par contre les Streblidae *Brachytarsina allaudi* et le groupe *Raymondia huberi* n'étaient connus que d'Afrique de l'Est, parasitant les chauves-souris des genres *Hipposideros*, *Cardioderma* ou *Triaenops* (groupe *R. huberi*) et *Epomophorus* (*B. allaudi*) (Theodor, 1968).

Dans l'ensemble des grottes, nous avons observé une tendance à des associations préférentielles entre les espèces d'ectoparasites et les différentes chauves-souris hôtes. En effet, *N. schmidlii scotti* et *P. fulvida* semblent parasiter préférentiellement *M. inflatus*, *E. africana* semble parasiter préférentiellement *R. aegyptiacus*, et le groupe *R. huberi* et *B. allaudi* lui semblent parasiter préférentiellement *Hipposideros caffer* et *H. gigas* respectivement. Des investigations plus approfondies, notamment sur l'origine des repas de sang, pourraient dans le futur aider à explorer les possibilités d'infestations accidentelles des chauves-souris par des ectoparasites. Nos résultats ont montré que si le nombre moyen d'ectoparasites par chauves-souris variait peu au cours du temps, le taux d'infestation (le degré de diffusion des ectoparasites dans une communauté de chauves-souris) présentait quant à lui des variations temporelles significatives. Il apparaît dès lors évident que cette variation affecte la dynamique de transmission des agents infectieux hébergés par les chauves-souris, en l'occurrence les parasites hémospories tel que *Polychromophilus melanipherus* que nous avons détecté avec les taux d'infection les plus élevés chez les espèces *N. schmidlii scotti* (12%) et *P. fulvida* (11,3%). Le rôle des ectoparasites de chauves-souris dans la transmission des hémospories du genre *Polychromophilus*, en particulier en milieu cavernicole, est bien connu (Adam and Landau, 1973b; Megali et al., 2011). Nos résultats suggèrent que *N. schmidlii scotti* et *P. fulvida* sont impliqués dans l'épidémiologie de *P. melanipherus* chez les chauves-souris cavernicoles du Gabon, comme cela a précédemment été démontré en Afrique Centrale pour *P. fulvida* (Adam and Landau, 1973b). Notre hypothèse est renforcée par le fait que de récentes



investigations parasitologiques réalisées chez les chauves-souris de la grotte du Faucon ont montré des taux d'infections élevés de *P. melanipherus* chez l'espèce *Miniopterus inflatus* (Duval et al., 2012), espèce que nous avons trouvée préférentiellement associée à *N. schmidlii scotti* et *P. fulvida*. Ces investigations ont montré également que *P. melanipherus* est une hémosporeidie ayant ses hôtes restreints aux chauves-souris *Miniopteridae* (Duval et al., 2012). Cependant de façon surprenante, nous avons détecté ce parasite dans quelques lots d'ectoparasites, dont *E. africana*, *B. allaudi* et groupe *R. huberi* collectés sur des chauves-souris autres que les *Miniopteridae*, c'est à dire *H. caffer*, *R. aegyptiacus* and *Coleura afra*, qui sont respectivement des *Hipposideridae*, *Pteropodidae*, et *Emballonuridae*. Ces résultats suggèrent que ces ectoparasites auraient pu se contaminer à partir de *M. inflatus* infectées, qui ne sont pas leur hôte primaire, démontrant ainsi la possibilité d'infestations occasionnelles d'hôtes secondaires. En revanche, c'est la première fois que le parasite *P. melanipherus* est retrouvé chez *N. schmidlii scotti*, *E. africana*, *B. allaudi* et le groupe *R. huberi*. Ces résultats ne permettent pas de prouver leur rôle comme vecteurs de *P. melanipherus*. Des études supplémentaires, telles que l'exploration des glandes salivaires pour retrouver des formes infectantes de ce parasite seraient nécessaires. A ce jour les *Streblidae* n'ont pas encore été démontrés comme des vecteurs d'hémosporeidies, néanmoins une étude récente a révélé la présence de sporozoïtes du parasite *Vetufefrus ovatus* (*Plasmodiidae*) dans des spécimens fossilisés de *Streblidae* (Poinar, 2011).

En somme, par l'étude des diptères hématophages de plusieurs grottes du Gabon, nous avons mis en évidence une diversité d'espèces restées jusqu'à présent mal connues. Leur caractère hématophage leur confère le potentiel de transmettre des agents infectieux dans les écosystèmes cavernicoles, et même en dehors, comme c'est le cas des parasites hémosporeidies. C'est également le cas pour les virus et divers bactéries hémotropes.

### 8.3. Diversité virale et bactérienne des diptères hématophages cavernicoles du Gabon : implication dans la transmission

#### *Diversité virale*

Les zoonoses constituent des réelles menaces pour la santé publique. Plusieurs études menées au Gabon ont montré le potentiel zoonotique associé aux chauves-souris cavernicoles (Maganga et al., 2011; Maganga et al., 2014a; Maganga et al., 2014b). Ces mammifères hébergent un grand nombre d'agents infectieux, dont de nombreux virus et bactéries, dont la transmission requiert l'implication active d'arthropodes hématophages (Melaun et al., 2014; Mühlendorfer, 2013). A ce jour, la circulation des virus et des bactéries transmis ou potentiellement transmis par des arthropodes hématophages dans les environnements cavernicoles du Gabon est restée peu documentée.

En dehors des virus infectant les plantes et les poissons, l'exploration des virus hébergés par les Culicidae, Phlebotominae et Ceratopogonidae des grottes de Kessipoughou et Djibilong nous a permis de détecter des séquences de virus infectant les vertébrés et les insectes correspondant en majorité à des Rhabdoviridae et des Flaviviridae chez les diptères criblés. Les Rhabdoviridae ont été retrouvés principalement chez les moustiques *Ur. cavernicola*, *Ur. nigromaculata*, *Cx. quasiquarti*, les phlébotomes *Sl. gigas* et *Ph. rodhaini*, et les cératopogonides *Culicoides* groupe *trifasciellus* ; et les Flaviviridae chez les moustiques *Ur. nigromaculata* et *Lu. tigripes*. Ces résultats suggèrent que les Rhabdoviridae et les Flaviviridae sont potentiellement les deux familles de virus les plus véhiculées par les diptères hématophages dans les grottes de Kessipoughou et Djibilong.

Les Rhabdoviridae peuvent causer des maladies zoonotiques graves chez les humains et la faune domestique. Des études ont montré que ces virus peuvent être transmis à leurs hôtes vertébrés par une implication active des moustiques des genres *Culex* ou *Stegomyia*, des phlébotomes des genres *Phlebotomus* et *Sergentomyia* et des

cératopogonides du genre *Culicoides* (Mavale et al., 2007; Mellor et al., 2000; Ramachandra Rao et al., 1967). Le criblage à haute profondeur de séquençage dans le lot mixte de moustiques a montré que la grande majorité des séquences de Rhabdoviridae détectées correspondait à un virus potentiellement nouveau, dont le Rhabdoviridae le plus proche est le virus Kamese, avec un pourcentage de divergence de 6%. Bien que le virus Kamese ait déjà été isolé chez des moustiques (*Culex*, *Stegomyia*, *Lutzia*) (Boussès et al., 2013; Dacheux et al., 2010; Henderson et al., 1967; Monath et al., 1979), il n'a à ce jour pas encore été identifié chez des vertébrés, et son épidémiologie en milieux naturels est encore mal connue. Toutefois nos résultats montrent que ce potentiel nouveau Kamese-like circule dans les milieux cavernicoles du Gabon et que les moustiques pourraient jouer un rôle central dans sa transmission. Cela suscite un intérêt majeur de poursuivre la caractérisation de ce virus.

Le criblage à haute profondeur de séquençage a permis de confirmer que les séquences de Flaviviridae détectées chez l'espèce de moustiques *Ur. nigromaculata* correspondaient dans leur grande majorité à un *Flavivirus* potentiellement nouveau dont le virus plus proche est le *Flavivirus* Yaoundé, avec un pourcentage de divergence de 13%. Ce virus rarement détecté dans la nature circule chez les moustiques, notamment du genre *Culex* au Cameroun, en République Centrafricaine, en République de Congo, et au Sénégal (Adam and Digoutte, 2005), et des cas d'infection chez des micromammifères (*Praomys* sp., *Cavia porcellus*) et des oiseaux (*Bycanistes sharpii*) ont déjà été rapportés (Adam and Digoutte, 2005). Nos résultats montrent que ce nouveau Flaviviridae potentiellement zoonotique circule au Gabon. Ils montrent entre autre la nécessité de poursuivre les recherches dans ces milieux potentiellement riches d'une diversité insoupçonnée d'arbovirus circulant dans des milieux peu explorés tels que les grottes.

En dehors des Rhabdoviridae et Flaviviridae, nous avons détecté en proportions moindres plusieurs séquences se rapportant à d'autres familles de virus pouvant infecter les vertébrés, notamment les Adenoviridae chez *Ur. nigromaculata*, mais aussi de façon surprenante les Coronaviridae (virus à syndrome respiratoire chez les vertébrés) chez *Culex* groupe *rima* et *Ph. rodhaini*. Cependant les résultats obtenus ne nous ont pas permis de statuer sur les espèces virales en présence. En revanche ils suscitent la nécessité d'entreprendre des recherches plus approfondies sur la caractérisation et la circulation potentielle des virus de ces familles chez les diptères hématophages cavernicoles du Gabon, l'identification des potentielles espèces vectrices, et éventuellement les espèces d'hôtes vertébrés qui les hébergent.

Ainsi bien que nos résultats permettent d'envisager un rôle des moustiques, des phlébotomes et des cératopogonides dans l'épidémiologie de ces potentiels nouveaux arbovirus en milieu cavernicole au Gabon, des études complémentaires, basées sur l'isolement de virus chez ces diptères, des infections expérimentales et des analyses phylogénétiques permettraient d'aller plus loin dans la caractérisation de ces virus et l'identification des espèces vectrices.

### ***Diversité bactérienne***

En explorant les communautés bactériennes nous avons observé que celles-ci étaient principalement dominées par les Alphaproteobacteria du genre *Wolbachia* chez l'ensemble des espèces de diptères, suggérant ainsi que les *Wolbachia* sont plus stablement adaptées que les autres bactéries chez ces derniers. Ainsi leur diffusion chez les diptères par transmission verticale (Werren et al., 2008) pourrait être à l'origine de leur forte dominance des communautés bactérienne. A la différence des *Wolbachia*, retrouvées en proportions variables chez l'ensemble des diptères, nous avons détecté la presque totalité des *Neisseria* chez les *Culicoides* du groupe *trifasciellus*, suggérant une forte association entre ces bactéries et *Culicoides* groupe

*trifasciellus*. A la différence des *Wolbachia* et *Neisseria* qui ont présenté des différences apparentes dans leur abondance en fonction des espèces de diptères, les *Staphylococcus* et la grande majorité des Gammaproteobacteria étaient présents de façon homogène chez l'ensemble des diptères, suggérant ainsi que ces bactéries font partie du microbiote permanent de plusieurs espèces de diptères. En revanche, la nature des interactions de ces bactéries et ces diptères hôtes reste encore à explorer.

Au cours de notre étude, nous avons détecté plusieurs genres de bactéries hémotropes (*Rickettsia*, *Anaplasma*, *Brucella*, *Bartonella*, *Yersinia*, *Francisella*, *Coxiella*, *Borrelia* et *Mycoplasma*). Ces bactéries zoonotiques infectent un grand nombre de vertébrés, dont l'homme ainsi que des animaux sauvages et domestiques, et sont responsables de diverses pathologies (Seitz, 2008). Leur distribution hétérogène et leur faible proportion par rapport aux autres bactéries stablement établies chez les diptères, suggèrent que leur présence est le résultat d'infections opportunistes exogènes. Nous avons détecté ces bactéries en grande partie chez les phlébotomes et les moustiques, notamment *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Rickettsia*, *Francisella* et *Coxiella* chez *Ph. rodhaini* et *Sl. gigas* ; *Bartonella*, *Brucella*, *Yersinia* chez *Ur. cavernicola* et *Ph. rodhaini* ; tandis que les *Mycoplasma* ont été détectées dans le lot multispécifique de moustiques et chez les *Culicoides* groupe *trifasciellus*, et les *Borrelia* l'ont été chez les *Culicoides* groupe *trifasciellus*. Les vecteurs principaux de ces bactéries connus à ce jour sont les tiques, et certaines espèces parmi les puces et les poux (Rodhain and Perez, 1985; Seitz, 2008). En revanche bien que nos résultats ne nous aient pas permis de caractériser à l'échelle spécifique ces bactéries, ils suscitent l'intérêt de pouvoir poursuivre les recherches chez les phlébotomes et les moustiques afin de mieux comprendre leur rôle éventuel dans l'épidémiologie de ces bactéries hémotropes dans les milieux cavernicoles d'Afrique centrale, et du Gabon en particulier.



# **CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES**



## CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

La modification et la conquête de nouveaux espaces naturels ont considérablement changé les contacts entre l'homme et la faune sauvage facilitant des transferts de pathogènes zoonotiques. L'anthropisation des milieux tels que les grottes, est susceptible d'augmenter l'exposition des populations humaines à une multitude d'agents infectieux circulant au sein de la faune cavernicole. La présence d'animaux sauvages ou domestiques dans l'environnement immédiat des grottes contribue également à augmenter un tel risque. Ainsi, comprendre les processus aboutissant à de tels transferts et prédire leur émergence dans la sphère anthropique constituent des défis majeurs pour les chercheurs et les autorités de santé publique. Face à cette problématique majeure des pays comptant de nombreux écosystèmes cavernicoles, l'objectif de cette thèse, ayant pour cadre d'étude le Gabon, était d'explorer la diversité de la faune entomologique diptérienne hématophage cavernicole et évaluer son implication dans la transmission d'agents infectieux. Les travaux que nous avons menés ont donc permis de réaliser un inventaire taxonomique des diptères hématophages colonisant les grottes que nous avons explorées. Avec un effectif représentant plus de 60% de l'ensemble des espèces de Culicidae connues (tous milieux confondus), et la découverte de plusieurs espèces de Phlebotominae, Ceratopogonidae, Nycteribiidae et Streblidae nouvelles pour le Gabon, notre étude a permis de mettre à jour une part importante de sa diversité de diptères hématophages cavernicoles. Elle a également permis d'élargir les champs de connaissances sur la répartition géographique de l'entomofaune cavernicole d'Afrique Centrale. Nos observations nous ont permis de comprendre que bien que les grottes partagent un certain nombre d'espèces en commun, elles demeurent toutefois singulières. Elles ont également permis de comprendre que la diversité et la dynamique des espèces au sein des communautés de diptères cavernicoles sont

fortement liées aux conditions du biotope. En outre, le criblage d'agents infectieux que nous avons réalisé nous a permis d'entrevoir la diversité parasitaire, virale et bactérienne associée aux diptères hématophages cavernicoles du Gabon. Ce criblage nous a permis d'identifier les espèces de Nycteribiidae impliquées dans la transmission de l'hémosporidie *Polychromophilus melanipherus*. Nos résultats ont également permis d'entrevoir un possible rôle des Streblidae dans la transmission d'hémosporidies. Cependant, des investigations supplémentaires s'avèrent nécessaires. Entre autres, le criblage par séquençage à haut débit que nous avons réalisé nous a permis d'identifier parmi les diptères cavernicoles, de potentiels vecteurs d'arbovirus et d'arbobactéries zoonotiques. Bien que nos données ne nous aient pas permis d'identifier ces agents infectieux à l'échelle spécifique, elles nous ont néanmoins renseignés sur les principales familles virales et genres bactériens potentiellement transmis par les diptères cavernicoles investigués. Ces données nous révèlent par la même occasion l'immense diversité insoupçonnée de virus et de bactéries véhiculés par l'entomofaune hématophage de ces environnements particuliers restés jusqu'alors peu investigués au Gabon.

Au regard des résultats obtenus au cours de cette thèse, des études plus approfondies permettraient d'enrichir davantage les connaissances sur la thématique de l'émergence zoonotique en lien avec les milieux cavernicoles en milieu tropical. Nous proposons d'élargir le cadre de l'étude à d'autres grottes à travers le Gabon. En effet, plusieurs dizaines de grottes sont recensées à travers le pays, cependant elles sont restées jusqu'à présent peu investiguées. De futures études en ce sens permettraient d'enrichir l'inventaire et de consolider la collection de référence de l'entomofaune cavernicole du Gabon hébergée au CIRMF. Du fait de l'isolement relatif des milieux hypogés, des études plus approfondies sur le plan de la systématique et la génétique des populations permettraient d'affiner la caractérisation des populations des diptères hématophages colonisant les grottes du Gabon. Entre

autres, des études de repas de sang chez les diptères hématophages permettraient de consolider les connaissances sur leurs relations avec les hôtes vertébrés cavernicoles qu'ils parasitent. Dans l'objectif de mieux caractériser les agents infectieux identifiés dans cette étude, et de potentiels agents infectieux à découvrir, la réalisation d'isolements en milieux de culture et le développement de systèmes PCRs adaptés permettraient d'apporter des résultats complémentaires à notre travail. Dans l'objectif d'améliorer la prévention des émergences zoonotiques, la veille entomologique dans les milieux anthropisés environnants des grottes contribuerait à l'évaluation des risques d'émergences zoonotiques en lien avec les milieux cavernicoles.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abadia, O.M., Gonzalez Morales, M.R., 2013. Paleolithic Art: A Cultural History. J. Archaeol. Res. 21, 269-306.
- Abonnenc, E., 1954. Sur un anophèle cavernicole de la Guinée : *Anopheles cavernicolus* n. sp. (Diptera-Culicidae). *Bull. Mém. Ec. Méd. Pharm. Dakar* 2, 288-290.
- Abonnenc, E., 1972. Les Phlébotomes de la Région Ethiopienne. Cah. ORSTOM. Ser. Entomol. Med. Parasitol 55, 289 PP.
- Abonnenc, E., Clastrier, J., 1974. Phlébotomes de la République de Guinée. *Isr J Entomol* 9, 55-76.
- ACR, A.C.R., 2014. African Chiroptera Report 2014. AfricanBats, AfricanBats, African Chiroptera Project, Pretoria, Republic of South Africa, pp. 1-6591.
- Adam, Landau, 1973a-a. Polychromophilus hemosporodia parasite de Microchiroptères au Congo. Sér. Ext. nkd. et Parasitol. XI, 147-115.
- Adam, F., Digoutte, J.P., 2005. Virus d'Afrique (base de données).
- Adam, J.P., 1961. *Anopheles caroni* n. sp. un anophèle (Diptera Culicidae) cavernicole de la République du Congo *Bull. Soc. Path. exot.* 54, 714-717.
- Adam, J.P., 1962. Un anophèle nouveau de la République du Congo (Brazzaville) *Anopheles (Neomyzomyia) hamoni* n. sp. (Diptera Culicidae) *Bull. Soc. Path. exot.* 55, 153-163.
- Adam, J.P., 1965a. Les Culicidae cavernicoles du Congo et de l'Afrique intertropicale. *Annales de Spéléologie* 20.
- Adam, J.P., 1965b. Transmission d'haemosporidies par des anophèles cavernicoles dans les grottes du Congo (Brazzaville). *Bull. Org. mond. Santé* 32, 598-602.
- Adam, J.P., 1966. Rapport sur une mission au Gabon pour l'étude préliminaire de la faune de quelques grottes de la région de Makokou
- Adam, J.P., 1967. Recherches sur les vecteurs de *Plasmodium* de petits mammifères au Congo et Etats voisins d'Afrique équatoriale et contribution à l'étude de la transmission de *Plasmodium chabeaudi* et *yoelii*. Cah. O.R.S.T.O.M. Sér. Ent. Med Parasitol N°11106
- Adam, J.P., 1973a. Hématozoaires des chiroptères d'Afrique Centrale. Cah. ORSTOM. Ser. Entomol. Med. Parasitol collection de Référence n° 6075.
- Adam, J.P., 1973b. Hématozoaires des chiroptères en Afrique Centrale. Cah. O.R.S.T.O.M. sér. Ent. Med 6075.
- Adam, J.P., 1974a. Les hémosporidies parasites d'animaux cavernicoles. Cah. O.R.S.T.O.M. sér. Ent. Med.
- Adam, J.P., 1974b. Les Hémosporidies parasites d'animaux cavernicoles. O.R.S.T.O.M. Fonds documentaires.
- Adam, J.P., 1974c. Transission d'hémosporides chez les animaux cavernicoles, International congress of parasitology. Facta Publication, Vienne, pp. 85-86.
- Adam, J.P., Caron, R., Vattier-Bernard, G., 1967. Etat actuel des recherches spéléologiques en République du Congo. *Spelunca Mémoires* 5.
- Adam, J.P., Landau, I., 1970 *Plasmodium Voltaicum* au Congo-Brazzaville *Journal Of Parasitology* 56, 391-393.
- Adam, J.P., Landau, I., 1973a-b. Polychromophilus hemosporodia parasite de Microchiroptères au Congo. Sér. Ext. nkd. et Parasitol. XI, 147-115.
- Adam, J.P., Landau, I., 1973b. Developmental stages of Polychromophilus sp., a parasite of insectivorous bats from the Congo-Brazzaville, in the nycteribiid fly *Penicillidia fulvida* Bigot 1889. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 67, 5-6.
- Akaike, H., 1974. A New Look at the Statistical Model Identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* 19, 716-723.
- Alahmed, A.M., 2012. Mosquito fauna (Diptera: Culicidae) of the Eastern Region of Saudi Arabia and their seasonal abundance. *Journal of King Saud University - Science* 24, 55-62.

- Ali, N., Khan, K., Wahid, S., Khan, N.H., Shah, S.U., 2016. Species composition and activity patterns of sand flies (Psychodidae: Phlebotomine) in four tehsils of Dir Districts, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Acta tropica* 156, 144-151.
- Alves, V.R., Freitas, R.A., Santos, F.L., Barrett, T.V., 2011. Diversity of sandflies (Psychodidae: Phlebotominae) captured in sandstone caves from Central Amazonia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106, 353-359.
- Angelakis, E., Mediannikov, O., Socolovschi, C., Mouffok, N., Bassene, H., Tall, A., Niangaly, H., Doumbo, O., Znazen, A., Sarih, M., 2014. *Coxiella burnetii*-positive PCR in febrile patients in rural and urban Africa. *International Journal of Infectious Diseases* 28, 107-110.
- ANOFEL, A.F.d.E.d.P.e.M., 2014. Ectoparasitoses : Poux (pédicules), puces, punaises et tiques. Université Médicales Virtuelle Francophone.
- Anti, P., Owusu, M., Agbenyega, O., Annan, A., Badu, E.K., Nkrumah, E.E., Tschapka, M., Oppong, S., Adu-Sarkodie, Y., Drosten, C., 2015a. Human-Bat Interactions in Rural West Africa. *Emerg. Infect. Dis* 21.
- Anti, P., Owusu, M., Agbenyega, O., Annan, A., Badu, E.K., Nkrumah, E.E., Tschapka, M., Oppong, S., Adu-Sarkodie, Y., Drosten, C., 2015b. Human-Bat Interactions in Rural West Africa. *Emerg. Infect. Dis* 21, 1418-1421.
- Appawu, M.A., Dadzie, S.K., Baffoe-Wilmot, A., Wilson, M.D., 2001. Lymphatic filariasis in Ghana: entomological investigation of transmission dynamics and intensity in communities served by irrigation systems in the Upper East Region of Ghana. *Tropical Medicine & International Health* 6, 511-516.
- Arribart, Y., Lushevici, O., Massad, R., Mesnier, G., Poisson, J., Testa, O., 2007. Résumé du rapport GABON'D 007, in: (92), E., (38), S.G.L.T. (Eds.).
- Asimeng, E.J., 1992. NATURAL HABITATS OF PHLEBOTOMINE SANDFLIES IN NORTHERN NIGERIA. *Insect Sci. Appl.* 13, 113-119.
- Atreya, P.L., Atreya, C.D., Pirone, T.P., 1991. Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, 7887-7891.
- Aubry, P., 2015. Pathologies infectieuses émergents. *Actualité 2015, Médecine Tropicale*.
- Ayala, S., Bradbury, J., Bradbury, S., 1981. Hepatocystis in *Hypsignathus monstrosus* (pteropinea) in Gaboon I. Hepatocystis malaria in a hammerhead bat population in Gaboon, West Africa. *Annales de parasitologie humaine et comparée* 56, 21-22.
- Ayala, S.C., Lee, D., 1970. Saurian malaria. Development of sporozoites in 2 species of phlebotomine sandflies *Science* 167, 891-&.
- Ba, Y., Trouillet, J., Thonnon, J., Fontenille, D., 1999. [Phlebotomus of Senegal: survey of the fauna in the region of Kedougou. Isolation of arbovirus]. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique* (1990) 92, 131-135.
- Barr, T.C.J., 1968. Cave ecology and the evolution of troglobites. *Evol. Biol.* 2, 35-102.
- Bartlett-Healy, K., Crans, W., Gaugler, R., 2009. Vertebrate hosts and phylogenetic relationships of amphibian trypanosomes from a potential invertebrate vector, *Culex territans* Walker (Diptera: Culicidae) *Journal of Parasitology* 95, 381-387.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S., 2015. lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4. *Journal of Statistical Software*.
- Bausch, D.G., Nichol, S.T., Muyembe-Tamfum, J.J., Borchert, M., Rollin, P.E., Sleurs, H., Campbell, P., Tshioko, F.K., Roth, C., Colebunders, R., Pirard, P., Mardel, S., Olinda, L.A., Zeller, H., Tshomba, A., Kulidri, A., Libande, M.L., Mulangu, S., Formenty, P., Grein, T., Leirs, H., Braack, L., Ksiazek, T., Zaki, S., Bowen, M.D., Smit, S.B., Leman, P.A., Burt, F.J., Kemp, A., Swanepoel, R., International, S., Technical Committee for Marburg Hemorrhagic Fever Control in the Democratic Republic of the, C., 2006. Marburg hemorrhagic fever associated with multiple genetic lineages of virus. *The New England journal of medicine* 355, 909-919.

- Becker, E., Venter, G.J., Labuschagne, K., Greyling, T., van Hamburg, H., 2013. The effect of anthropogenic activity on the occurrence of *Culicoides* species in the South-Western Khomas Region, Namibia. *Veterinaria italiana* 49, 277-284.
- Berger, L.R., Hawks, J., de Ruiter, D.J., Churchill, S.E., Schmid, P., Delezene, L.K., Kivell, T.L., Garvin, H.M., Williams, S.A., DeSilva, J.M., Skinner, M.M., Musiba, C.M., Cameron, N., Holliday, T.W., Harcourt-Smith, W., Ackermann, R.R., Bastir, M., Bogin, B., Bolter, D., Brophy, J., Cofran, Z.D., Congdon, K.A., Deane, A.S., Dembo, M., Drapeau, M., Elliott, M.C., Feuerriegel, E.M., Garcia-Martinez, D., Green, D.J., Gurtov, A., Irish, J.D., Kruger, A., Laird, M.F., Marchi, D., Meyer, M.R., Nalla, S., Negash, E.W., Orr, C.M., Radovcic, D., Schroeder, L., Scott, J.E., Throckmorton, Z., Tocheri, M.W., VanSickle, C., Walker, C.S., Wei, P., Zipfel, B., 2015. *Homo naledi*, a new species of the genus *Homo* from the Dinaledi Chamber, South Africa. *Elife* 4.
- Bhatt, P.N., Rodrigues, F., 1967. Chandipura: a new Arbovirus isolated in India from patients with febrile illness. *Indian Journal of Medical Research* 55, 1295-1305.
- Billeter, S.A., Hayman, D.T.S., Peel, A.J., Baker, K., Wood, J.L.N., Cunningham, A., Suu-Ire, R., Dittmar, K., Kosoy, M.Y., 2012. *Bartonella* species in bat flies (Diptera: Nycteribiidae) from western Africa. *Parasitology* 139, 324-329.
- Billeter, S.A., Levy, M.G., Chomel, B.B., Breitschwerdt, E.B., 2008. Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick transmission. *Med. Vet. Entomol.* 22, 1-15.
- Bonning, B.C., 2009. The Dicistroviridae: An emerging family of invertebrate viruses. *Virologica sinica* 24, 415-427.
- Boorman, J., 1989. *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) of the Arabian Peninsula with notes on their medical and veterinary importance, *Fauna of Saudi Arabia*, pp. 160-224.
- Borkent, A., 2005. The biting midges - The Ceratopogonidae (Diptera). , in: C., M.W. (Ed.), *Biology and disease vectors*. Elsevier academic Press, pp. 113-126.
- Bourgarel, M., 2009. Etude des risques liés aux populations de chiroptères cavernicoles dans le nord-est du Gabon. Mission préliminaire de localisation des grottes et d'identification des espèces de chauves souris dans le région de Bélinga - Gabon
- Boussès, P., Dehecq, J., Brengues, C., Fontenille, D., 2013. Inventaire actualisé des moustiques (Diptera: Culicidae) de l'île de La Réunion, océan Indien. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 106, 113-125.
- Bowman, D.D., 2011. Introduction to the alpha-proteobacteria: *Wolbachia* and *Bartonella*, *Rickettsia*, *Brucella*, *Ehrlichia*, and *Anaplasma*. *Topics in companion animal medicine* 26, 173-177.
- Brady, J., 1964. The occurrence of *Anopheles smithii* var. *rageai* Mattingly and *Adamin* Ghana, with a note on its possible implication as a vector of non-human malaria. *Zoological Laboratory, University of Cambridge*.
- Brook, C.E., Bai, Y., Dobson, A.P., Osikowicz, L.M., Ranaivoson, H.C., Zhu, Q., Kosoy, M.Y., Dittmar, K., 2015. *Bartonella* spp. in Fruit Bats and Blood-Feeding Ectoparasites in Madagascar. *Plos Neglect. Trop. Dis.* 9.
- Brown, L., Murray, V., 2013. Examining the relationship between infectious diseases and flooding in Europe: A systematic literature review and summary of possible public health interventions. *Disaster Health* 1, 117-127.
- Brunhes, J., 1977. Les moustiques de l'archipel des Comores Cah. O.R.S.T.O.M. Sér. Ent. Med Parasitol 15, 131-152.
- Bsrat, A., Berhe, N., Balkew, M., Yohannes, M., Teklu, T., Gadisa, E., Medhin, G., Abera, A., 2015. Epidemiological study of cutaneous leishmaniasis in Saesie Tsaeda-emba district, eastern Tigray, northern Ethiopia. *Parasites & vectors* 8, 758-758.
- Burgdorfer, W., 1984. Discovery of the Lyme disease spirochete and its relation to tick vectors *Yale Journal of Biology and Medicine* 57, 515-520.
- Calisher, C.H., Childs, J.E., Field, H.E., Holmes, K.V., Schountz, T., 2006. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clinical microbiology reviews* 19, 531-545.



- Callot, J., Kremer, M., Mouchet, J., Bach, A., 1965. Contribution à l'étude des *Ceratopogonidae* (Diptera) de Kumba (Cameroun). Description de *C. kumbaensis* n. sp. . Bull. Soc. path. Exo 58, 536-548.
- Campbell, C.L., Mummey, D.L., Schmidtman, E.T., Wilson, W.C., 2004. Culture-independent analysis of midgut microbiota in the arbovirus vector *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae). J. Med. Entomol. 41, 340-348.
- Canute, P., Khamala, M., Kettle, D.S., 1971. The *Culicoides* Latreilles (Diptera : Ceratopogonidae) of East Africa. *Trans. R. ent. Soc. Lond.* 123, 1-95.
- Carrau, L., 1876. L'origine des cultes primitifs, Revue des deux mondes, Rue des deux mondes ed.
- Cascio, A., Bosilkovski, M., Rodriguez-Morales, A.J., Pappas, G., 2011. The socio-ecology of zoonotic infections. *Clinical Microbiology and Infection* 17, 336-342.
- Caugant, D.A., 1998. Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. *Apmis* 106, 505-525.
- Chao, A., 1987. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability *Biometrics* 43.
- Chapman, J.W., Williams, T., Escribano, A., Caballero, P., Cave, R.D., Goulson, D., 1999. Age-related cannibalism and horizontal transmission of a nuclear polyhedrosis virus in larval *Spodoptera frugiperda*. *Ecological Entomology* 24, 268-275.
- Chavaillon, J., 2000. Le paléolithique inférieur et les premiers habitats en Afrique, in: Touré, C.J.K. (Ed.), De la Préhistoire aux débuts de la civilisation. UNESCO, pp. 117-137.
- Chen, L., Liu, B., Yang, J., Jin, Q., 2014. DBatVir: the database of bat-associated viruses. *Database : the journal of biological databases and curation* 2014, bau021.
- Chua, K.B., Crameri, G., Hyatt, A., Yu, M., Tompang, M.R., Rosli, J., McEachern, J., Crameri, S., Kumarasamy, V., Eaton, B.T., Wang, L.-F., 2007. A previously unknown reovirus of bat origin is associated with an acute respiratory disease in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 11424-11429.
- Clerc, Y., Rodhain, F., Digoutte, J., Tesh, R., Heme, G., Coulanges, P., RANAIVOSATA, J., RANDRIARINORO, J., 1982. Le virus Périnet, Rhabdoviridae, du genre Vesiculovirus isolé à Madagascar de Culicidés. *Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar* 49, 119-129.
- Comer, J., Tesh, R., 1991. Phlebotomine sand flies as vectors of vesiculoviruses: a review. *Parassitologia* 33, 143-150.
- Conrardy, C., Tao, Y., Kuzmin, I.V., Niezgoda, M., Agwanda, B., Breiman, R.F., Anderson, L.J., Rupprecht, C.E., Tong, S., 2014. Molecular detection of adenoviruses, rhabdoviruses, and paramyxoviruses in bats from Kenya. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 91, 258-266.
- Cornet, M., 1969. Les *Culicoides* de l'Ouest africain (1ère notes). Cah. ORSTOM. Ser. Entomol. Med. Parasitol 7, 341-364.
- Cornet, M., 1981. Ceratopogonidae. Durand Jean-René (ed.), Lévêque Christian (ed.). Flore et faune aquatiques de l'Afrique sahélo-soudanienne : Paris : ORSTOM 2, 625-641.
- Cornet, M., Nevill, E.M., Walker, A.R., 1974. Notes sur les *Culicoides* (Diptera, *Ceratopogonidae*) du groupe de *C. milnei* Austen, 1909, en Afrique orientale et australe. Cah. ORSTOM. Ser. Entomol. Med. Parasitol 12, 231-243.
- Corson, P.J., Ourdy, J., 1962. Histoire de la médecine Soc. fr. d'Hist. de la Méd. mai-juin, 3-14.
- Cottew, G., Yeats, F., 1982. Mycoplasmas and mites in the ears of clinically normal goats. *Australian Veterinary Journal* 59, 77-81.
- Coulanges, P., Robin, Y., Le Gonidec, G., Mayoux, A., Bordahandy, R., 1974. Chiroptères et arbovirus à Madagascar (isoleent de souches de virus Dakar-bat. Etude sérologique de chauves-souris frugivores). *Arch. Inst. Pasteur Madagascar* 43, 109-118.

- Cox-Foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N.A., Quan, P.-L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D.M., 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318, 283-287.
- Crabtree, M.B., Sang, R.C., Stollar, V., Dunster, L.M., Miller, B.R., 2003. Genetic and phylogenetic characterization of the newly described insect flavivirus, Kamiti River Virus. *Arch. Virol.* 148, 1095-1118.
- Cross, J., 1971. Japanese encephalitis virus surveillance in Taiwan. II. Isolations from mosquitoes and bats in Taipei area 1969-1970. *Journal of the Formosan Medical Association* 70, 681-686.
- Culter, S.J., Fooks, A.R., Van Der Poel, W.H., 2010. Public health threat of new, reemerging, and neglected zoonoses in the industrialized world. *Emerg. Infect. Dis* 16, 1-7.
- D'Arcy, C.J., Burnett, P., Hewings, A., 1981. Detection, biological effects, and transmission of a virus of the aphid *Rhopalosiphum padi*. *Virology* 114, 268-272.
- Dacheux, L., Berthet, N., Dissard, G., Holmes, E.C., Delmas, O., Larrous, F., Guigon, G., Dickinson, P., Faye, O., Sall, A.A., 2010. Application of broad-spectrum resequencing microarray for genotyping rhabdoviruses. *J. Virol.* 84, 9557-9574.
- Daoud, W., Rioux, J.A., Delalbre-Belmonte, A., Dereure, J., Rageh, H.A., 1989. Écoépidémiologie des leishmanioses viscérales et cutanées en République arabe du Yémen. *Bull Soc Pathol Exot* 82, 669-677.
- Davoust, B., Bourry, O., Gomez, J., Lafay, L., Casali, F., Leroy, E., Parzy, D., 2006. Surveys on seroprevalence of canine monocytic ehrlichiosis among dogs living in the Ivory Coast and Gabon and evaluation of a quick commercial test kit dot-ELISA. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078, 464-469.
- De Leon, A.A.P., O'Toole, D., Tabachnick, W.J., 2006. Infection of guinea pigs with vesicular stomatitis New Jersey virus Transmitted by *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae). *J Med Entomol* 43, 568-573.
- De Leon, A.A.P., Tabachnick, W.J., 2006. Transmission of vesicular stomatitis New Jersey virus to cattle by the biting midge *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae). *J. Med. Ent.* 43, 323-329.
- Delaunay, P., Blanc, V., Del Giudice, P., Levy-Bencheton, A., Chosidow, O., Marty, P., Brouqui, P., 2011. Bedbugs and Infectious Diseases. *Clinical Infectious Diseases* 52, 200-210.
- Delecolle, J.-C., Paupy, C., Rahola, N., Mathieu, B., 2013. Description morphologique et moléculaire d'une nouvelle espèce de *Culicoides* (*Avaritia*) du Gabon (Diptera, Ceratopogonidae). *Bull Soc Entomol France* 118, 513-519.
- Delorme, G., 1979. Recherches Spéléologiques dans l'est du Gabon. *Spelunca* 4, 539-564.
- Depaquit, J., Muller, F., Gantier, J.C., Leger, N., Ferte, H., Ready, P., Niang, A.A., 2005. Phlebotomine sand flies from Ouagadougou, Burkina Faso: first record of *Phlebotomus* (*Larrousius*) *longicuspis* south of the Sahara. *Med. Vet. Entomol.* 19, 322-325.
- Dethier, M., Hubart, J.-M., 2005. La "troglobitude" : adaptation à la vie souterraine. *Notes fauniques de Gembloux* 57, 29-48.
- Dhanda, V., Rodrigues, F., Ghosh, S., 1970. Isolation of Chandipura virus from sandflies in Aurangabad. *Indian Journal of Medical Research* 58, 179-180.
- Dia, I., Lochouart, L., Boccolini, D., Costantini, C., Fontenille, D., 2000. Spatial and temporal variations of the chromosomal inversion polymorphism of *Anopheles funestus* in Senegal. *Parasite* 7, 179-184.
- Diagne, N., Fontenille, D., Konate, L., Faye, O., Lamizana, M.T., Legros, F., Molez, J.F., Trape, J.F., 1994. Les anopheles du Sénégal. *Bull Soc Pathol Exot* 87, 267-277.
- Diallo, M., Thonnon, J., Moumouni, T.-L., Fontenille, D., 1999. Vectors of Chikungunya virus in Senegal : current data and transmission cycles *Am J Trop Med Hyg* 60, 281-286.
- Dick, C.W., Dittmar, K., 2014. Parasitic bat flies (Diptera: Streblidae and Nycteribiidae): host specificity and potential as vectors, in: Klimpel, S., Mehlhorn, H. (Eds.), *Bats (Chiroptera) as vectors of diseases and parasites Parasitology Research Monographs Springer-Verlag Berlin Heidelberg*.



- Dick, C.W., Patterson, B.D., 2006. Batflies - Obligate ectoparasites of bats. *Micrommials and Macroparasites From Evolutionary Ecology to Management*, 179 - 196.
- Dick, C.W., Patterson, B.D., 2007. Against all odds: explaining high host specificity in dispersal-prone parasites. *International journal for parasitology* 37, 871-876.
- Dieng, H., Rahman, G.S., Hassan, A.A., Salmah, M.C., Satho, T., Miake, F., al, e., 2012. The effects of simulated rainfall on immature population dynamics of *Aedes albopictus* and female oviposition. *Int J Bio Met* 56, 113-120.
- Dittmar, K., Dick, C.W., Patterson, B.D., Whiting, M.F., Gruwell, M.E., 2009. Pupal deposition and ecology of bat flies (Diptera: Streblidae): *Trichobius* sp. (caecus group) in a Mexican cave habitat. *J Parasitol* 95, 308-314.
- Divo, A., Benavides, G., 1978. Papel del *Rhodnius prolixus* en la transmission del virus de la encefalitis equina Venezolana. *Invest clin* 19, 108-115.
- Dossou-Yovo, J., Doannio, J.M., Diarrassouba, S., 1998. [Feeding preferences of malaria vectors in the city of Bouake and in the surrounding villages of Cote d'Ivoire]. *Bull Soc Pathol Exot* 91, 257-258.
- Dougall, A.M., Alexander, B., Holt, D.C., Harris, T., Sultan, A.H., Bates, P.A., Rose, K., Walton, S.F., 2011. Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. *International journal for parasitology* 41, 571-579.
- Duron, O., Labbé, P., Berticat, C., Rousset, F., Guillot, S., Raymond, M., Weill, M., 2006. High *Wolbachia* density correlates with cost of infection for insecticide resistant *Culex pipiens* mosquitoes. *Evolution* 60, 303-314.
- Duval, L., Mejean, C., Maganga, G.D., Makanga, B.K., Koumba, L.B.M., Peirce, M.A., Ariey, F., Bourgarel, M., 2012. The chiropteran haemosporidian *Polychromophilus melanipherus*: A worldwide species complex restricted to the family Miniopteridae. *Infection Genetics and Evolution* 12, 1558-1566.
- Edwards, F.W., 1941. Mosquitoes of the Ethiopian Region. BRITISH MUSEUM (NATURAL HISTORY), LONDON. 499 PP., ILLUS., 4 PLS.
- Faburay, B., Wilson, W.C., Gaudreault, N.N., Davis, A.S., Shivanna, V., Bawa, B., Sunwoo, S.Y., Ma, W.J., Drolet, B.S., Morozov, I., McVey, D.S., Richt, J.A., 2016. A Recombinant Rift Valley Fever Virus Glycoprotein Subunit Vaccine Confers Full Protection against Rift Valley Fever Challenge in Sheep. *Scientific Reports* 6.
- Fain, A., 1972. Notes sur les punaises parasites de chiroptères de la République du Zaïre avec description de deux espèces et d'une sous-espèce nouvelles. *Rev. Zool. Bot. Afr.* 85, 187-202.
- Falconi, C., Lopez-Olvera, J.R., Gortazar, C., 2011. BTV infection in wild ruminants, with emphasis on red deer: A review. *Veterinary microbiology* 151, 209-219.
- Farajollahi, A., Crans, W.J., Nickerson, D., Bryant, P., Wolf, B., Glaser, A., Andreadis, T.G., 2005. Detection of West Nile virus RNA from the louse fly *Icosta americana* (Diptera: Hippoboscidae). *Journal of the American Mosquito Control Association* 21, 474-476.
- Fontenille, D., Traore-Lamizana, M., Trouillet, J., Leclerc, A., Mondo, M., Ba, Y., Digoutte, J.P., Zeller, H.G., 1994. First isolations of arboviruses from phlebotomine sand flies in West Africa. *Am J Trop Med Hyg* 50, 570-574.
- Frost, T., Testa, O., 2009. Speleological projects 2007 and 2008 to Gabon (Central Africa) *Berliner Höhlenkundliche Berichte* 36.
- Gál, J., Hornyák, Á., Mándoki, M., Bakonyi, T., Balka, G., Szeredi, L., Marosán, M., Ludányi, T., Forgách, P., Sós, E., 2013. Novel mastadenovirus infection and clinical disease in a pygmy marmoset (*Callithrix [Cebuella] pygmaea*). *Veterinary microbiology* 167, 695-699.
- Gamble, D.W., Dogwiler, J.T., Mylroie, J., 2000. Field assessment of the microclimatology of tropical flank margin caves. *Clim Res* 16, 37-50.
- Gao, B., Mohan, R., Gupta, R.S., 2009. Phylogenomics and protein signatures elucidating the evolutionary relationships among the Gammaproteobacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 59, 234-247.

- Geevarghese, G., Arankalle, V., Jadi, R., Kanojia, P., Joshi, M., Mishra, A., 2005. Detection of Chandipura virus from sand flies in the genus *Sergentomyia* (Diptera: Phlebotomidae) at Karimnagar district, Andhra Pradesh, India. *J. Med. Entomol.* 42, 495-496.
- Gendrin, M., Christophides, G.K., 2013. The Anopheles mosquito microbiota and their impact on pathogen transmission. *Anopheles mosquitoes-New insights into malaria vectors* 10, 55107.
- Gillies, M.T., De Meillon, B., 1968. Anophelinae of Africa south of the Sahara (Ethiopian Zoogeographical region). South African Institute for Medical Research Publication 54.
- Glick, J.I., 1990. *Culicoides Biting Midges* (Diptera: Ceratopogonidae) of Kenya. *J. Med. Ent.* 27, 85-195.
- Gomariz-Zilber, E., Thomas-Orillard, M., 1993. Drosophila C virus and Drosophila hosts: a good association in various environments. *Journal of evolutionary biology* 6, 677-689.
- Gomez, M.S., Vega, P.B., Fernandez, T.P., 2013. What can fleas (Insecta, Siphonaptera) tell us about animals inhabiting caves *Boletin de la Asociacion Española de Entomologia* 37, 74-84.
- Gouveia de Almeida, A.P., 2011. Mosquitoes (Diptera, Culicidae) and their medical importance for Portugal: challenges for the 21st century. *Acta medica portuguesa* 24, 961-974.
- Grard, G., Fair, J.N., Lee, D., Slikas, E., Steffen, I., Muyembe, J.-J., Sittler, T., Veeraraghavan, N., Ruby, J.G., Wang, C., Makuwa, M., Mulembakani, P., Tesh, R.B., Mazet, J., Rimoin, A.W., Taylor, T., Schneider, B.S., Simmons, G., Delwart, E., Wolfe, N.D., Chiu, C.Y., Leroy, E.M., 2012a. A Novel Rhabdovirus Associated with Acute Hemorrhagic Fever in Central Africa. *Plos Pathog* 8.
- Grard, G., Fair, J.N., Lee, D., Slikas, E., Steffen, I., Muyembe, J.-J., Sittler, T., Veeraraghavan, N., Ruby, J.G., Wang, C., Makuwa, M., Mulembakani, P., Tesh, R.B., Mazet, J., Rimoin, A.W., Taylor, T., Schneider, B.S., Simmons, G., Delwart, E., Wolfe, N.D., Chiu, C.Y., Leroy, E.M., 2012b. A Novel Rhabdovirus Associated with Acute Hemorrhagic Fever in Central Africa. *Plos Pathogens* 8.
- Grunnill, M., Boots, M., 2016. How Important is Vertical Transmission of Dengue Viruses by Mosquitoes (Diptera: Culicidae)? *J. Med. Entomol.* 53, 1-19.
- Gu, W., Lampman, R., Noval, R.J., 2004. Assessment of arbovirus vector infection rates using variable size pooling. *J Med Entomol* 18, 200-204.
- Guan, Y., Zheng, B.J., He, Y.Q., Liu, X.L., Zhuang, Z.X., Cheung, C.L., Luo, S.W., Li, P.H., Zhang, L.J., Guan, Y.J., Butt, K.M., Wong, K.L., Chan, K.W., Lim, W., Shortridge, K.F., Yuen, K.Y., Peiris, J.S., Poon, L.L., 2003. Isolation and characterization of viruses related to SARS coronavirus from animals in southern China. *Science* 302, 276-278.
- Guerrero, R., Bain, O., Attout, T., Martin, C., 2006. The infective larva of *Litomosoides yutajensis* Guerrero et al., 2003 (Nematoda : Onchocercidae), a Wolbachia-free filaria from bat. *Parasite-Journal De La Societe Francaise De Parasitologie* 13, 127-130.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O., 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic biology* 59, 307-321.
- Gunders, A.E., Hadini, A., 1974. Transission of mammalian piroplasm by an Argasid tick. *Nature Lond* 247, 225-226.
- Guzman, M.G., Kouri, G., 2002. Dengue: an update. *Lancet. Infect. Dis.* 2, 33-42.
- Haddow, A.J., Ssenkubuge, Y., 1963. Studies on the biting habits of East African mosquitoes in the genera *Uranotaenia*, *Ficalbia* and *Hogdesia*. *Bull Ent Res* 53, 639-652.
- Hagan, H.R., 1951. Embryology of the viviparous insects. Roland press, New York.
- Hamon, J., 1963. Les moustiques anthropophiles de la région de Bobo-Dioulasso (République de Haute-Volta). Cycle d'agressivité et variations saisonnières. *Annales de la Société Entomologique de France* 132.
- Hamon, J., Adam, J.P., 1956. Observations sur la répartition et le comportement des anophèles de l'Afrique Equatoriale Française, du Cameroun et de l'Afrique Occidentale *Bull Wld Hlth Org* 15, 549-594.

- Harood, R.F., James, M.T., 1979. Entomology in Human and Animal Health.
- Hatfill, S., Williamson, C., Kirby, R., Von Wechmar, M., 1990. Identification and localization of Aphid lethal paralysis virus particles in thin tissue sections of the *Rhopalosiphum padi* aphid by in situ nucleic acid hybridization. *Journal of Invertebrate Pathology* 55, 265-271.
- Hayes, E.B., Komar, N., Nasci, R.S., Montgomery, S.P., O'Leary, D.R., Campbell, G.L., 2005. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerg. Infect. Dis* 11.
- Hayman, D.T., Bowen, R.A., Cryan, P.M., McCracken, G.F., O'Shea, T.J., Peel, A.J., Gilbert, A., Webb, C.T., Wood, J.L., 2013. Ecology of zoonotic infectious diseases in bats: current knowledge and future directions. *Zoonoses Public Health* 60, 2-21.
- Henderson, B.E., Tukei, P.M., Lule, M., West, R., Mujomba, E., 1967. Arbovirus identification studies. Isolations from mosquitoes. *East African Virus Research Report* 17.
- Herbeuval, D., 2002. Les bactéries hemotropes chez le chat. Université Paris-Est Créteil Val de Marne (UPEC).
- Herbold, J., Heuschele, W., Berry, R., Parsons, M., 1983. Reservoir of St. Louis encephalitis virus in Ohio bats. *American journal of veterinary research* 44, 1889-1893.
- Hoshino, K., Isawa, H., Tsuda, Y., Yano, K., Sasaki, T., Yuda, M., Takasaki, T., Kobayashi, M., Sawabe, K., 2007. Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from *Culex pipiens* mosquito in Japan. *Virology* 359, 405-414.
- Howarth, F.G., 1972. Cavernicoles in lava tubes on the island of Hawaiï. *Science* 175, 325-326.
- Howarth, F.G., 1982. The conservation of cave invertébrates *Proc. Int. Cave Manage. Symp.* 1st., Murray, Ky. 1981 in press.
- Howarth, F.G., 1983. Ecology of cave arthropods *Ann. Rev. Entomol.* 28, 365-389.
- Huang, B., Allcock, R., Warrilow, D., 2016. Newly characterized arboviruses of northern Australia. *Virol. Rep.* 6, 11-17.
- Itoua, A., Cornet, M., 1986. Les *Ceratopogonidae* (Diptera) du Mayombe congolais. 3. *Revue taxonomique des espèces du genre Culicoides Latreille, 1809. Cah. ORSTOM. Ser. Entomol. Med. Parasitol* 24, 233-250.
- Itoua, A., Cornet, M., Vattier-Bernard, G., Trouillet, J., 1987a. Les culicoides (Diptera, Ceratopogonidae) d'Afrique Centrale. *Cah. ORSTOM. Ser. Entomol. Med. Parasitol numero spécial.*
- Itoua, A., Cornet, M., Vattier-Bernard, G., Trouillet, J., 1987b. Les *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) d'Afrique Centrale. *Cah. ORSTOM. Ser. Entomol. Med. Parasitol numero spécial,* 127-134.
- Jacomo, V., Raoult, D., 2000. Human infections caused by Bartonella spp. Part 1. *Clinical Microbiology Newsletter* 22, 1-5.
- Jánoska, M., Vidovszky, M., Molnár, V., Liptovszky, M., Harrach, B., Benkő, M., 2011. Novel adenoviruses and herpesviruses detected in bats. *The Veterinary Journal* 189, 118-121.
- Jansen van Vuren, P., Wiley, M., Palacios, G., Storm, N., McCulloch, S., Markotter, W., Birkhead, M., Kemp, A., Paweska, J.T., 2016. Isolation of a Novel Fusogenic Orthoreovirus from *Eucampsipoda africana* Bat Flies in South Africa. *Viruses* 8.
- Jansson, E., 1971. Isolation of fastidious mycoplasma from human sources. *Journal of clinical pathology* 24, 53.
- Jeannel, R., 1926. Faune cavernicole de la France. *Encyclopédie Entomologique Paris* 7.
- Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L., Daszak, P., 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451, 990-993.
- Juberthie, C., 2005. La naissance et le développement de la Biospéologie ante et post Emile Racovitza (1907). *Endins* 28, 35-50.
- Junglen, S., Kopp, A., Kurth, A., Pauli, G., Ellerbrok, H., Leendertz, F.H., 2009. A new flavivirus and a new vector: characterization of a novel flavivirus isolated from *uranotaenia* mosquitoes from a tropical rain forest. *J. Virol.* 83, 4462-4468.

- Jurado, V., Laiz, L., Rodriguez-Nava, V., Boiron, P., Hermosin, B., Sanchez-Moral, S., Saiz-Jimenez, C., 2010. Pathogenic and opportunistic microorganisms in caves. *International Journal of Speleology* 39, 15-24.
- Kan, E., Anjili, C.O., Saini, R.K., Hidaka, T., Githure, J.I., 2004. Phlebotomine sandflies (Diptera : Psychodidae) collected in Mukusu, Machakos District, Kenya and their nocturnal flight activity. *Applied Entomology and Zoology* 39, 651-659.
- Kassahun, A., Sadlova, J., Benda, P., Kostalova, T., Warburg, A., Hailu, A., Baneth, G., Volf, P., Votypka, J., 2015. Natural infection of bats with *Leishmania* in Ethiopia. *Acta tropica* 150, 166-170.
- Keller, F., 2012. Les nouvelles menaces des maladies infectieuses émergentes.
- Kohl, C., Kurth, A., 2014. European Bats as Carriers of Viruses with Zoonotic Potential. *Viruses-Basel* 6, 3110-3128.
- Konstantinov, O.K., Diallo, S.M., Inapogi, A.P., Ba, A., Kamara, S.K., 2006. The mammals of Guinea as reservoirs and carriers of arboviruses. *Med Parazitol (Mosk)* 1, 34-39.
- Kosoy, M., Bai, Y., Lynch, T., Kuzmin, I.V., Niezgoda, M., Franka, R., Agwanda, B., Breiman, R.F., Rupprecht, C.E., 2010. *Bartonella* spp. in bats, Kenya. *Emerg Infect Dis* 16, 1875-1881.
- Kuzmin, I., Novella, I., Dietzgen, R., Padhi, A., Rupprecht, C., 2009. The rhabdoviruses: biodiversity, phylogenetics, and evolution. *Infection, Genetics and Evolution* 9, 541-553.
- Kuzmin, I.V., Niezgoda, M., Franka, R., Agwanda, B., Markotter, W., Beagley, J.C., Urazova, O.Y., Breiman, R.F., Rupprecht, C.E., 2008a. Lagos bat virus in Kenya. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 1451-1461.
- Kuzmin, I.V., Niezgoda, M., Franka, R., Agwanda, B., Markotter, W., Beagley, J.C., Urazova, O.Y., Breiman, R.F., Rupprecht, C.E., 2008b. Possible emergence of West Caucasian bat virus in Africa. *Emerg Infect Dis* 14, 1887-1889.
- Kuzmin, I.V., Turmelle, A.S., Agwanda, B., Markotter, W., Niezgoda, M., Breiman, R.F., Rupprecht, C.E., 2011. Commerson's Leaf-Nosed Bat (*Hipposideros commersoni*) is the Likely Reservoir of Shimoni Bat Virus. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 11, 1465-1470.
- Laarman, J.J., 1959. A new species of *Anopheles* from a rainforest in eastern belgian Congo. *Trop. and geogr. medecine* 2, 147-156.
- LaBeaud, A.D., Sutherland, L.J., Muiruri, S., Muchiri, E.M., Gray, L.R., Zimmerman, P.A., Hise, A.G., King, C.H., 2011. Arbovirus prevalence in mosquitoes, Kenya. *Emerg Infect Dis* 17, 233-241.
- Lambert, D.M., 1983. A population gnetical study of the African mosquito *Anopheles marshallii* (Theobald). *Evolution* 37, 484-495.
- Landau, I., 1973. Diversité des mécanismes assurant la pérennité de l'infection chez les sporozoaires coccidiomorphes. *M. M. N. H. N. Zool.*
- Landau, I., Adam, J.P., 1973. Two types of schizonts of *Hepatocystis* sp., a parasite of insectivorous bats in the Congo-Brazzaville. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 67, 6-7.
- Landau, I., Chabaud, A.G., Miltgen, F., Baccam, D., 1980a. [*Dionisia bunoi* n. g. n. sp., Haemoproteidae parasite of the microchiropteran bat *Hipposideros cyclops* in Gabon (author's transl)]. *Annales de parasitologie humaine et comparee* 55, 271-280.
- Landau, I., Chavatte, J.M., Karadjian, G., Chabaud, A., Beveridge, I., 2012. The haemosporidian parasites of bats with description of *Sprattiella alecto* gen. nov., sp. nov. *Parasite* 19, 137-146.
- Landau, I., Rosin, G., Miltgen, F., Hugot, J.-P., Leger, N., Beveridge, I., Baccam, D., 1980b. Sur le genre *Polychromophilus*. *Annales de Parasitologie* 55, 13-32.
- Lane, R.P., Abdel-Hafez, Kamhawi, 1988. The distribution of phlebotomine sand flies in the principal ecological zones of Jordan. *Med. Vet. Entomol.* 2, 237-246.
- Larranaga, C., Kajon, A., Villagra, E., Avendano, L.F., 2000. Adenovirus surveillance on children hospitalized for acute lower respiratory infections in Chile (1988–1996). *Journal of medical virology* 60, 342-346.



- Lavoie, K.H., 1981. The relation of bacteria and fungi to invertebrate communities. Invertebrate response to inorganic enrichment of cave substrates. *Cave Res. Found.* 1979 Ann. Pep, 22-23.
- Lawyer, P.G., Mebrahtu, Y.B., Ngumbi, P.M., Mwanyumba, P., Mbugua, J., Kiilu, G., Kipkoech, D., Nzovu, J., Anjili, C.O., 1991. *Phlebotomus Guggisbergi* (Diptera, Psychodidae), a vector of *Leishmania tropica* in Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44, 290-298.
- Lekana-Douki, S.E., Kombila-Koumavor, C., Nkoghe, D., Drosten, C., Drexler, J.F., Leroy, E.M., 2015. Molecular epidemiology of enteric viruses and genotyping of rotavirus A, adenovirus and astrovirus among children under 5 years old in Gabon. *International Journal of Infectious Diseases* 34, 90-95.
- Leleup, N., 1952. Un anophèle nouveau du Kibali-Itouri. *Anopheles faini* n. sp. . *Rev. Zool. Bot. Afr.* 46, 151-158.
- Leleup, N., 1956. Description de deux grottes du Bas-Congo  
Notes biospéléologiques 73-80.
- Leleup, N., Lips, M., 1950a. Un anophèle cavernicole nouveau du Katanga *Anophèles rodhaini* n. sp. . *Revue de Zoologie et de Botanique Africaines* 43 303-308
- Leleup, N., Lips, M., 1950b. Un anophèle nouveau du Katanga. *Anopheles rodhaini*. *Rev. Zool. Bot. Afr.* 43, 303-308.
- Leleup, N., Lips, M., 1951. Notes descriptives complémentaires sur *Anopheles rodhaini* *Revue de Zoologie et de Botanique Africaines* 44, 169-172.
- Leroy, E.M., Kumulungui, B., Pourrut, X., Rouquet, P., Hassanin, A., Yaba, P., Delicat, A., Paweska, J.T., Gonzalez, J.P., Swanepoel, R., 2005. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature* 438, 575-576.
- Lesage, M., 2014. Zoonoses émergentes et réémergents : enjeux et perspectives. *Centre d'étude et de prospective* 66, 1-4.
- Lewis, S., Rice, A., Hurst, G., Baylis, M., 2014. First detection of endosymbiotic bacteria in biting midges *Culicoides pulicaris* and *Culicoides punctatus*, important Palaearctic vectors of bluetongue virus. *Med. Vet. Entomol.* 28, 453-456.
- Li, L., Victoria, J.G., Wang, C., Jones, M., Fellers, G.M., Kunz, T.H., Delwart, E., 2010. Bat guano virome: predominance of dietary viruses from insects and plants plus novel mammalian viruses. *J Virol* 84, 6955-6965.
- Li, W., Shi, Z.L., Yu, M., Ren, W., Smith, C., Epstein, J.H., Wang, G., Crameri, G., Hu, Z., Zhang, H., Zhang, J., MacEachern, J., Field, H., Daszak, P., Eaton, B.T., Zhang, S., Wang, F., 2005. Bats are reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* 310.
- Lignier, V., 2008. Eléments de karstologie et géologie pour spéléo - stage de perfectionnement du CDS 69.
- Lips, M., 1960 *Anophèles du Congo, faune des grottes et des anfractuosités*. *RIVISTA DI PARASSITOLOGIA*. 1960 Déc 1;21(4):290-306. . *RIVISTA DI PARASSITOLOGIA*. 21, 290-306.
- Maa, T.C., 1962. Records and descriptions of Nycteribiidae and Streblidae (Diptera). *Pacific Insects* 4, 417-436.
- Mackenzie, J.S., Gubler, D.J., Petersen, L.R., 2004. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nature medicine* 10, S98-S109.
- Maganga, G.D., Bourgarel, M., Ella, G.E., Drexler, J.F., Gonzalez, J.P., Drosten, C., Leroy, E.M., 2011. Is Marburg virus enzootic in Gabon? *The Journal of infectious diseases* 204 Suppl 3, S800-803.
- Maganga, G.D., Bourgarel, M., Nkoghe, J.O., N'Dilimabaka, N., Drosten, C., Paupy, C., Morand, S., Drexler, J.F., Leroy, E.M., 2014a. Identification of an Unclassified Paramyxovirus in *Coleura afra*: A Potential Case of Host Specificity. *PLoS One* 9.
- Maganga, G.D., Bourgarel, M., Vallo, P., Dallo, T.D., Ngoagouni, C., Drexler, J.F., Drosten, C., Nakouné, E.R., Leroy, E.M., Morand, S., 2014b. Bat distribution size or shape as determinant of viral richness in african bats. *PLoS One* 9, e100172.

- Magnarelli, L.A., Freier, J.E., Anderson, J.F., 1987. Experimental infection of mosquitos with *Borrelia burgdorferi*, the ethiologic agent of Lyme disease J. Infect. Dis. 156, 694-695.
- Magurran, A.E., 1988. Ecological diversity and its measurement. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Magurran, A.E., 2003. Measuring biological diversity. John Willey & Sons 264.
- Marcondes, C.B., 2007. A proposal of generic and subgeneric abbreviation for phlebotomine sandflies (Diptera : Psychododae : Phlebotominae) of the world. Entomological News 118, 351-356.
- Marié, J.L., Shaw, S., Langton, D., Bourry, O., Gomez, J., Davoust, B., 2009. Sub-clinical infection of dogs from the Ivory Coast and Gabon with Ehrlichia, Anaplasma, Mycoplasma and Rickettsia species. Clin. Microbiol. Infec. 15, 284-285.
- Marshall, A.G., 1970. The life cycle of *Basilia hispida* Theodor 1967 (Diptera: Nycteribiidae) in Malaysia. Parasitology 61, 1-18.
- Martin, C., Bain, O., Jouvenet, N., Raharimanga, V., Robert, V., Rousset, D., 2006. First report of *Litmosa* spp. (Nematoda : Filarioidea) from Malagasy bats; review of the genus and relationships between species. Parasite-Journal De La Societe Francaise De Parasitologie 13, 3-10.
- Matile, L., 1970. Les diptères cavernicoles. Annales de Spéléologie 25.
- Matile, L., 1994. Diptera. Encyclopedia biospeologica Tome 1, 340-343.
- Mattingly, P.F., 1954. Notes on Ethiopian *Uranotaenia* (Diptera-Culicidae) with description of a new species. Proc. R. Ent. Soc. Lond (B) 23, 167-171.
- Mattingly, P.F., Adam, J.P., 1954. A new species of cave-dwelling anopheline from the french Cameroon. *Ann Trop Med Parasitol* 48.
- Mavale, M., Fulmali, P., Geevarghese, G., Arankalle, V., Ghodke, Y., Kanojia, P., Mishra, A., 2006. Venereal transmission of Chandipura virus by *Phlebotomus papatasi* (Scopoli). The American journal of tropical medicine and hygiene 75, 1151-1152.
- Mavale, M.S., Fulmali, P.V., Ghodke, Y.S., Mishra, A.C., Kanojia, P., Geevarghese, G., 2007. Experimental transmission of Chandipura virus by *Phlebotomus argentipes* (Diptera: Psychodidae). The American journal of tropical medicine and hygiene 76, 307-309.
- Megali, A., Yannic, G., Christe, P., 2011. Disease in the dark: molecular characterization of *Polychromophilus murinus* in temperate zone bats revealed a worldwide distribution of this malaria-like disease. Mol Ecol 20, 1039-1048.
- Melaun, C., Werblow, A., Busch, M.W., Liston, A., Klimpel, S., 2014. Bats as potential reservoir hosts for vector-borne diseases, Bats (Chiroptera) as Vectors of Diseases and Parasites. Springer Berlin Heidelberg, pp. 25-61.
- Mellor, P.S., Boorman, J., Baylis, M., 2000. Culicoides biting midges: Their role as arbovirus vectors. Annual Review of Entomology 45, 307-340.
- Mer, G.G., Goldblum, N., 1947. A haemosporidian of bats. Nature 159, 444-444.
- Monath, T., Cropp, C., Frazier, C.L., Murphy, F., Whitfield, S.G., 1979. Viruses isolated from reptiles: Identification of three new members of the family Rhabdoviridae. Arch. Virol. 60, 1-12.
- Morand, S., Bouamer, S., Hugot, J.-P., 2006. Nematodes, in: Morand, S., Krasnov, B.R., Poulin, R. (Eds.), Micromammals macroparasites: From evolutionary to ecology management. Springer-Verlag, Tokyo, pp. 63-79.
- Morse, S.F., Dick, C.W., Patterson, B.D., Dittmar, K., 2012a. Some Like It Hot: Evolution and Ecology of Novel Endosymbionts in Bat Flies of Cave-Roosting Bats (Hippoboscoidea, Nycterophiliinae). Applied and environmental microbiology 78, 8639-8649.
- Morse, S.F., Olival, K.J., Kosoy, M., Billeter, S., Patterson, B.D., Dick, C.W., Dittmar, K., 2012b. Global distribution and genetic diversity of *Bartonella* in bat flies (Hippoboscoidea, Streblidae, Nycteribiidae). Infection Genetics and Evolution 12, 1717-1723.
- Mouchet, J., Gariou, J., Rivola, E., 1957a. Observations sur la biologie d'*Anopheles smithi* var. *rageaui* Mattingly et Adam 1954, vecteur d'un plasmodium de mammifère aux environs de Yaoundé (Sud-Cameroun). Bull Soc Pathol Exot 50.

- Mouchet, J., Gariou, J., Rivola, E., 1957b. Observations sur la biologie d'*Anopheles smithii* var. *rageaui* Mattingly et Adam 1954 vecteur d'un *Plasmodium* de mammifère aux environs de Yaoundé (Sud-Cameroun). Bull. Soc. path. Exo 50, 157-164.
- Mourembou, G., Lekana-Douki, J.B., Mediannikov, O., Nzondo, S.M., Kouna, L.C., Essone, J.C.B.B., Fenollar, F., Raoult, D., 2015. Possible role of *Rickettsia felis* in acute febrile illness among children in Gabon. Emerg. Infect. Dis 21, 1808.
- Mühldorfer, K., 2013. Bats and bacterial pathogens: a review. Zoonoses Public Health 60, 93-103.
- Mutinga, M.J., Dipeolu, O.O., 1990. Saurian malaria in Kenya. Epidemiologic features of malarial infections in lizard populations of the Pokot district. International journal for parasitology 20, 149-153.
- Nayduch, D., Cohnstaedt, L.W., Saski, C., Lawson, D., Kersey, P., Fife, M., Carpenter, S., 2014. Studying Culicoides vectors of BTV in the post-genomic era: Resources, bottlenecks to progress and future directions. Virus Research 182, 43-49.
- Nieves-Rivera, A.M., Santos-Flores, C.J., Dugan, F.M., Miller, T.E., 2009. Guanophilic fungi in three caves of southwestern Puerto Rico. Int. J. Speleol. 38, 71-82.
- Nkoghe, C.N., Horie, M., Fujita, S., Ogino, M., Kobayashi, Y., Mizukami, K., Masatani, T., Ezzikouri, S., Matsuu, A., Mizutani, T., 2016. Molecular epidemiological study of adenovirus infecting western lowland gorillas and humans in and around Moukalaba-Doudou National Park (Gabon). Virus Genes, 1-8.
- Nowak, R.M., 1994. Walker's bats of the world. JHU Press.
- Obame-Nkoghe, J., Rahola, N., Bourgarel, M., Yangari, P., Prugnolle, F., Maganga, G.D., Leroy, E.M., Fontenille, D., Ayala, D., Paupy, C., 2016. Bat flies (Diptera: Nycteribiidae and Streblidae) infesting cave-dwelling bats in Gabon: diversity, dynamics and their potential role in the *Polychromophilus melanipherus* transmission. Parasites & vectors 9.
- Ofori, F., Francki, R., 1985. Transmission of leafhopper A virus, vertically through eggs and horizontally through maize in which it does not multiply. Virology 144, 152-157.
- Ogawa, G.M., Pereira Junior, A.M., Resadore, F., Mattos Ferreira, R.d.G., Medeiros, J.F., Aranha Camargo, L.M., 2016. Sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) from caves in the state of Rondonia, Brazil. Revista Brasileira De Parasitologia Veterinaria 25, 61-68.
- OHI, O.H.I.A.o.w.o.c., 2014.
- OIE, O.M.d.I.S.A., 2015. Santé animale, un défi aux multiple facettes. Unité de la communication.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., R., K., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Wagner, H., 2013. vegan: Community Ecology Package. R package version 2.0-10.
- Olival, K.J., Dick, C.W., Simmons, N.B., Morales, J.C., Melnick, D.J., Dittmar, K., Perkins, S.L., Daszak, P., Desalle, R., 2013. Lack of population genetic structure and host specificity in the bat fly, *Cyclopodia horsfieldi*, across species of *Pteropus* bats in Southeast Asia. Parasit Vectors 6, 231.
- Ono, M., Braig, H.R., Munstermann, L.E., Ferro, C., O'Neil, S.L., 2001. Wolbachia infections of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). J. Med. Entomol. 38, 237-241.
- Oslisly, R., 2007. Patrimoine souterrain : les grottes du Gabon. Total Gabon.
- Oslisly, R., Pickford, M., Dechamps, R., Fontugne, M., Maley, J., 1994. Sur une présence humain mi-holocène à caractère rituel en grottes du Gabon. C.R. Acad. Sci. Paris 319, 1423-1428.
- Otake, S., Dee, S.A., Rossow, K.D., Moon, R.D., Pijoan, C., 2002. Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by mosquitoes, *Aedes vexans* (Meigen). Canadian Journal of Veterinary Research 66, 191-195.
- Parker, J.L., White, K.K., 1992. Lyme borreliosis in cattle and horses: a review of the literature. The Cornell veterinarian 82, 253-274.
- Parrot, L., Schwetz, 1937. Revue de Zoologie et de Botanique Africaines 29, 224-226.
- Parrot, L., Wanson, M., 1938. Phébotomes du Congo Belge VIII. Sur le mâle de *Phebotomus gigas*. Revue de Zoologie et de Botanique Africaines 31, 153-156.



- Parrot, L., Wanson, M., 1946. Arch. Institut Pasteur d'Algérie 24, 143-152.
- Pernet, O., 2012. Etude et protection de la biodiversité : Exemple d'un environnement complexe et fragile : le milieu karstique.
- Peyrot, B., Massala, J., 1987. Contribution à l'étude des systèmes Karstiques gabonais. Karstologia 9, 37-44.
- Phan, T.G., Shimizu, H., Nishimura, S., Okitsu, S., Maneekarn, N., Ushijima, H., 2005. Human adenovirus type 1 related to feline adenovirus: evidence of interspecies transmission. Clinical laboratory 52, 515-518.
- Platt, K.B., Mangiafico, J.A., Rocha, O.J., Zaldivar, M.E., Mora, J., Trueba, G., Rowley, W.A., 2000. Detection of dengue virus neutralizing antibodies in bats from Costa Rica and Ecuador. J. Med. Entomol. 37, 965-967.
- Plowright, R.K., Eby, P., Hudson, P.J., Smith, I.L., Westcott, D., Bryden, W.L., Middleton, D., Reid, P.A., McFarlane, R.A., Martin, G., Tabor, G.M., Skerratt, L.F., Anderson, D.L., Cramer, G., Quammen, D., Jordan, D., Freeman, P., Wang, L.F., Epstein, J.H., Marsh, G.A., Kung'u, N.Y., McCallum, H., 2015a. Ecological dynamics of emerging bat virus spillover. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences 282.
- Plowright, R.K., Eby, P., Hudson, P.J., Smith, I.L., Westcott, D., Bryden, W.L., Middleton, D., Reid, P.A., McFarlane, R.A., Martin, G., Tabor, G.M., Skerratt, L.F., Anderson, D.L., Cramer, G., Quammen, D., Jordan, D., Freeman, P., Wang, L.F., Epstein, J.H., Marsh, G.A., Kung'u, N.Y., McCallum, H., 2015b. Ecological dynamics of emerging bat virus spillover. Proc R Soc Lond B Biol Sci 282.
- Poinar, G.O., Jr., 2011. *Vetufefrus ovatus* n. gen., n. sp. (Haemospororida: Plasmodiidae) vectored by a streblid bat fly (Diptera: Streblidae) in Dominican amber. Parasit Vectors 4, 229.
- Posada, D., Crandall, K.A., 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics 14, 817-818.
- Pourrut, X., Souris, M., Towner, J.S., Rollin, P.E., Nichol, S.T., Gonzalez, J.-P., Leroy, E., 2009. Large serological survey showing cocirculation of Ebola and Marburg viruses in Gabonese bat populations, and a high seroprevalence of both viruses in *Rousettus aegyptiacus*. BMC Infectious Diseases 9.
- Pringle, C., 1977. Genetics of rhabdoviruses, Regulation and Genetics. Springer, pp. 239-289.
- Prugnolle, F., Durand, P., Neel, C., Ollomo, B., Ayala, F.J., Arnathau, C., Etienne, L., Mpoudi-Ngole, E., Nkoghe, D., Leroy, E., Delaporte, E., Peeters, M., Renaud, F., 2010. African great apes are natural hosts of multiple related malaria species, including *Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci U S A 107, 1458-1463.
- Quan, P.-L., Firth, C., Conte, J.M., Williams, S.H., Zambrana-Torrel, C.M., Anthony, S.J., Ellison, J.A., Gilbert, A.T., Kuzmin, I.V., Niezgod, M., Osinubi, M.O.V., Recuenco, S., Markotter, W., Breiman, R.F., Kalemba, L., Malekani, J., Lindblade, K.A., Rostal, M.K., Ojeda-Flores, R., Suzan, G., Davis, L.B., Blau, D.M., Ogunkoya, A.B., Alvarez Castillo, D.A., Moran, D., Ngam, S., Akaike, D., Agwanda, B., Briese, T., Epstein, J.H., Daszak, P., Rupprecht, C.E., Holmes, E.C., Lipkin, W.I., 2013. Bats are a major natural reservoir for hepaciviruses and pegiviruses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110, 8194-8199.
- Quan, P.-L., Firth, C., Street, C., Henriquez, J.A., Petrosov, A., Tashmukhamedova, A., Hutchison, S.K., Egholm, M., Osinubi, M.O.V., Niezgod, M., Ogunkoya, A.B., Briese, T., Rupprecht, C.E., Lipkin, W.I., 2010. Identification of a Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-Like Virus in a Leaf-Nosed Bat in Nigeria. Mbio 1.
- Racovitza, E.G., 1907. Essai sur les problèmes biospéologiques Arch. Zool. Exp. Gén. 4, 371-488.
- Raharimanga, V., Arie, F., Cardiff, S.G., Goodman, S.M., Tall, A., Rousset, D., Robert, V., 2003. Hemoparasites of bats in Madagascar. Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar 69, 70-76.

- Rahola, N., Depaquit, J., Makanga, B.K., Paupy, C., 2013. *Phlebotomus* (*Legeromyia*) *multihamatus* subg. nov., sp nov from Gabon (Diptera: Psychodidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108, 845-849.
- Rahola, N., Henni, L.H., Obame, J., Ayala, D., Makanga, B.K., Lehrter, V., Izri, A., Paupy, C., Depaquit, J., 2016. A molecular study of the genus *Spelaemyia* (Diptera: Phlebotominae) with description of the male of *Spelaemyia moucheti*. *Parasite Vector* 9.
- Ramachandra Rao, T., Singh, K., Dhanda, V., Bhatt, P., 1967. Experimental transmission of Chandipura virus by mosquitoes. *Indian Journal of Medical Research*, 1306-1310.
- Ramasindrazana, B., Dellagi, K., Lagadec, E., Randrianarivelosoa, M., Goodman, S.M., Tortosa, P., 2016. Diversity, Host Specialization, and Geographic Structure of Filarial Nematodes Infecting Malagasy Bats. *PLoS One* 11.
- Raut, C., Yadav, P., Towner, J., Amman, B., Erickson, B., Cannon, D., Sivaram, A., Basu, A., Nichol, S., Mishra, A., 2012. Isolation of a novel adenovirus from *Rousettus leschenaultii* bats from India. *Intervirology* 55, 488-490.
- Reeves, W.K., Loftis, A.D., Gore, J.A., Dasch, G.A., 2005. Molecular evidence for novel bartonella species in *Trichobius major* (Diptera: Streblidae) and *Cimex adjunctus* (Hemiptera: Cimicidae) from two southeastern bat caves, U.S.A. *Journal of vector ecology : journal of the Society for Vector Ecology* 30, 339-341.
- Reiman, D.A., 1993. The identification of uncultured microbial pathogens. *Journal of Infectious Diseases* 168, 1-8.
- Reinhardt, K., Siva-Jothy, M.T., 2007. Biology of the bed bugs (Cimicidae), *Annual Review of Entomology*, pp. 351-374.
- Remillet, M., 1973. Aperçu de la faune souterraine à Madagascar, *Livre du cinquantenaire de l'Institut de Spéléologie "Emile Racovitza"*. Colloque National de Spéléologie. Editura Academiei Republicii Socialiste Romania Bucuresti-Cluj, pp. 135-160.
- Renault, D., 2008. Evolution de la résistance aux stress environnementaux chez les ectothermes : Les milieux cavernicoles, in: 1, U.R. (Ed.).
- Rickenbach, A., Boreham, P.F.L., Weitz, B., Germain, M., Eouzan, J.P., 1974. Etude des préférences trophiques des moustiques (Diptera, Culicidae) de la région de Yaoundé (Cameroun) par la méthode des tests de précipitines. *cah. O.R.S.T.O.M. sér. Ent. med et Parasitol.* 12, 179-189.
- Robert, D.R., Hoch, A.L., Dixon, K.E., Llewellyng, C.H., 1981. Oropouche virus. 3 : Entomological observations from three epidemics in Para, Brazil, 1975. *Am J Trop Med Hyg* 30, 165-171.
- Rodhain, F., Perez, C., 1985. *Précis d'entomologie médicale et vétérinaire*. Maloine s.a.
- Roiz, D., Ruiz, S., Soriguer, R., Figuerola, J., 2015. Landscape Effects on the Presence, Abundance and Diversity of Mosquitoes in Mediterranean Wetlands. *PLoS One* 10, e0128112.
- Rolain, J., Bourry, O., Davoust, B., Raoult, D., 2005. Bartonella quintana and Rickettsia felis in Gabon. *Emerg. Infect. Dis* 11, 1742.
- Rosin, G., Landau, I., Hugot, J.P., 1978. [Considerations on the genus Nycteria (Haemoproteidae) parasite of African Microchiroptera with the description of 4 new species (author's transl)]. *Annales de parasitologie humaine et comparee* 53, 447-459.
- Rush, W.A., Francly, D.B., Smith, G.C., Cropp, C.B., 1980. Transmission of an arbovirus by a member of the family Cimicidae. *Ann Entomol Soc America* 73, 315-318.
- Ryckman, R.E., Bentley, D.G., Archbold, E.F., 1981. The Cimicidae of the Americas and Oceanic Islands, a checklist and bibliography. *Bull Soc Vector Ecol* 6, 93-142.
- Saiz-Jimenez, C., 2012. Microbiological and environmental issues in show caves. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 28, 2453-2464.
- Salazar, R., Castillo-Neyra, R., Tustin, A.W., Borrini-Mayorí, K., Náquira, C., Levy, M.Z., 2015. Bed bugs (*Cimex lectularius*) as vectors of *Trypanosoma cruzi*. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 92, 331-335.

- Sant'Anna, M.R., Darby, A.C., Brazil, R.P., Montoya-Lerma, J., Dillon, V.M., Bates, P.A., Dillon, R.J., 2012. Investigation of the bacterial communities associated with females of *Lutzomyia* sand fly species from South America. *PLoS One* 7, e42531.
- Schaer, J., Reeder, D.M., Vodzak, M.E., Olival, K.J., Weber, N., Mayer, F., Matuschewski, K., Perkins, S.L., 2015. Nyctereria parasites of Afrotropical insectivorous bats. *International journal for parasitology* 45, 375-384.
- Schiner, J.R., 1854. Fauna der Adelsberg, lueger und Magdalener Grotte. in A. Schmild, die Grotten und Hohlen von Adelsberg, Lueg, Planida und Laas. Wien, Braunmuller.
- Seccombe, A.K., Ready, P.D., Huddlestone, L.M., 1993. A catalog of Old World Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). *Nat Hist Mus*.
- Seitz, R., 2008. Arbovirologia—pathogens transmittable by arthropods. *Transfus Med Hemother* 35, 374-390.
- Service, M.W., 1965. The identification of blood meals from culicine mosquitoes from Nigeria. *Bull Ent Res* 55, 637-643.
- Service, M.W., 1976. Contribution to the knowledge of the mosquitoes (Diptera, Culicidae) of Gabon. *Cah. ORSTOM. Ser. Entomol. Med. Parasitol* 14, 259-263.
- Shannon, C.E., 1949. *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois Press. 117p.
- Shi, Z., 2010. Bat and virus. *Protein & cell* 1, 109-114.
- Shi, Z.L., 2013. Emerging infectious diseases associated with bat viruses. *Sci. China-Life Sci.* 56, 678-682.
- Shope, R.E., 1982. Rabies-related viruses. *The Yale journal of biology and medicine* 55, 271.
- Shortridge, K., Pudney, M., Varma, M., 1972. Infection of a mosquito cell line with human type 5 adenovirus. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 66, 363-368.
- Singh, B., Daneshvar, C., 2013. Human infections and detection of *Plasmodium knowlesi*. *Clinical microbiology reviews* 26, 165-184.
- Sondag, F., Van Ruymbeke, M., Soubiès, F., Santos, R., Somerhausen, A., Seidel, A., Boggiani, P., 2003. Monitoring present day conditions in tropical caves using an environmental data acquisition system (EDAS). *J. Hydrol.* 273, 103-118.
- Stanek, G., Strle, F., 2003. Lyme borreliosis. *The Lancet* 362, 1639-1647.
- Stefanato, J.P., 2015. Tout sur le genre *Niphargus*, *Info Souterraine* pp. 86-87.
- Steffen, I., Simmons, G., 2014. Emerging Rhabdoviruses. *Biology and Pathogenesis of Rhabdo-and Filoviruses*, 311.
- Strinati, P., 1960. La faune actuelle des trois grottes d'Afrique Equatoriale Française *Annales de Speleologie* 15, 532-538.
- Swanson, D.A., 1973. Pahoehoe flows from the 1969-1971 Manua Ulu eruption, Kilauea Volcano, Hawaii. *Bull. Geol. Soc. Am.* 84, 615-626.
- Tantely, M.L., Le Goff, G., Boyer, S., Fontenille, D., 2016. An updated checklist of mosquito species (Diptera: Culicidae) from Madagascar. *Parasite* 23, 20.
- Telford, S.R., 1984. Haemoparasites of reptiles, in: Hoff, G.L., Frye, F.L., Jacobson, E.R. (Eds.), *Diseases of amphibians and reptiles*, pp. 385-517.
- Tene Fossog, B., Ayala, D., Acevado, P., Ngomo Abeso Mebuy, I., Makanga, B., Magnus, J., Awono-Ambene, P., Njiokou, F., Pombi, M., Antonio-Nkondjio, A., Paupy, C., Besansky, N.J., Constantini, C., 2015. Habitat segregation and ecological character displacement in cryptic African malaria mosquitoes. *Evolutionary Applications*.
- Tesh, R.B., Modi, G.B., 1983. Growth and transovarial transmission of Chandipura virus (Rhabdoviridae: Vesiculovirus) in *Phlebotomus papatasi*. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 32, 621-623.
- Testa, O., Oslisly, R., 2013. *Sous la jungle retse le Mystère, Spéléomag*, pp. 36-38.
- Theodor, O., 1957. The Nycteribiidae of the Ethiopian region and Madagascar. *Parasitology* 47.
- Theodor, O., 1967. An illustrated catalogue of the Rothschild collection of *Nycteribiidae* (Diptera) in the British Museum. (N.H.), Lond. British Museum (N. H.).

- Theodor, O., 1968. A revision of the Streblidae (Diptera) of the Ethiopian Region Trans. R. ent. Soc. of Lond. 120, 313-373.
- Thompson, N.N., Auguste, A.J., Travassos da Rosa, A.P.A., Carrington, C.V.F., Blitvich, B.J., Chadee, D.D., Tesh, R.B., Weaver, S.C., Adesiyun, A.A., 2015. Seroepidemiology of Selected Alphaviruses and Flaviviruses in Bats in Trinidad. Zoonoses and Public Health 62, 53-60.
- Traavik, T., Mehl, R., Kjeldsberg, E., 1977. "Runde "virus, a coronavirus-like agent associated with seabirds and ticks. Archives of virology 55, 25-38.
- Tvrkovic, N., 2012. Vertebrate visitors - Birds and Mammals, in: Culver, W.B.W.D.C. (Ed.), Encyclopedia of caves. Elsevier.
- Tzeng, Y.-L., Stephens, D.S., 2000. Epidemiology and pathogenesis of Neisseria meningitidis. Microbes and Infection 2, 687-700.
- Valladas, H., Clottes, J., Geneste, J.M., Garcia, M.A., Arnold, M., Cachier, H., Tisnerat-Laborde, N., 2001. Palaeolithic paintings - Evolution of prehistoric cave art. Nature 413, 479-479.
- Van Den Berghe, L., Lambrecht, F.L., Zaghi, A., 1958. Démonstration du cycle sexué de Plasmodium atheruri n. sp. au Congo belge. Ann. Soc. belge Med. trop. 38.
- Van Der Poel, W.H., Lina, P.H.C., Kramps, J.A., 2006. Public health awareness of emerging zoonotic viruses of bats: a European perspective. Vector Borne Zoonotic Dis. 6, 315-324.
- Van Munster, M., Janssen, A., Clériveret, A., Van den Heuvel, J., 2005. Can plants use an entomopathogenic virus as a defense against herbivores? Oecologia 143, 396-401.
- Van Someren, E.C.C., Mutinga, M.J., 1971. Interesting mosquito records from Kenya. Mosq. Syst. Newsletter 3, 211.
- Vandel, A., 1964. Biospéléologie La biologie des animaux cavernicoles 1.
- Vattier-Bernard, G., 1970a. Contribution à l'étude systématique et biologique des phlébotomes cavernicoles en Afrique intertropicale (1ère partie). Cah. O.R.S.T.O.M. Sér. Ent. med. Parasitol 3.
- Vattier-Bernard, G., 1970b. Contribution à l'étude systématique et biologique des phlébotomes cavernicoles en Afrique intertropicale (2ème partie) Cah. O.R.S.T.O.M. Sér. Ent. Med Parasitol 3.
- Vattier-Bernard, G., 1971a. Etudes morphologique et biologique des phlébotomes cavernicoles du Congo-Brazzaville. Annales de Speleologie 26.
- Vattier-Bernard, G., 1971b. Notes sur la biologie de deux espèces de phlébotomes cavernicoles africains. Bull. Soc. Ecol. 2, 293-301.
- Vattier-Bernard, G., Abonnenc, E., 1967. *Phebotomus moucheti* (Diptera Psychodidae), espèce nouvelle, capturée dans les grottes au Cameroun et en République Centrafricaine. Cah. ORSTOM. Ser. Entomol. Med. Parasitol 5, 67-70.
- Vattier-Bernard, G., Adam, J.P., 1966a. Capture de ceratopogonidae (Diptera) dans les grottes de la République Gabonaise. Cah. ORSTOM. Ser. Entomol. Med. Parasitol, 21.
- Vattier-Bernard, G., Adam, J.P., 1966b. Les *Ceratopogonidae* des grottes de la République du Congo Annales de Speleologie 21, 711-773.
- Vattier-Bernard, G., Adam, J.P., 1969. Connaissances actuelles sur la répartition géographique des phlébotomes cavernicoles africains; Considérations sur l'habitat et la biologie. Annales de Speleologie 24, 143-161.
- Votycka, J., Szabova, J., Radrova, J., Zidkova, L., Svobodova, M., 2012. Trypanosoma culicavium sp nov., an avian trypanosome transmitted by Culex mosquitoes. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 62, 745-754.
- Vythilingam, I., Tan, C.H., Nazni, W.A., 2005. Transmission potential of Wuchereria bancrofti by Culex quinquefasciatus in urban areas of Malaysia. Tropical biomedicine 22, 83-85.
- Walker, P.J., Firth, C., Widen, S.G., Blasdel, K.R., Guzman, H., Wood, T.G., Paradkar, P.N., Holmes, E.C., Tesh, R.B., Vasilakis, N., 2015. Evolution of genome size and complexity in the Rhabdoviridae. PLoS Pathog 11, e1004664.
- Wang, J., Moore, N.E., Murray, Z.L., McInnes, K., White, D.J., Tompkins, D.M., Hall, R.J., 2015a. Discovery of novel virus sequences in an isolated and threatened bat species, the



- New Zealand lesser short-tailed bat (*Mystacina tuberculata*). *Journal of General Virology* 96, 2442-2452.
- Wang, Y., Zhong, D., Cui, L., Lee, M.-C., Yang, Z., Yan, G., Zhou, G., 2015b. Population dynamics and community structure of *Anopheles* mosquitoes along the China-Myanmar border. *Parasites & vectors* 8.
- Wanson, M., Lebiec, B., 1945. *Anopheles (Myzomyia) vanhoofi* sp. n. . *Revue de Zoologie et de Botanique Africaines* 39, 199-129.
- Wenzel, R.L., Tripton, V.J., 1966. some relationships between mammals hosts and their ectoparasites. *Field Mus Nat Hist, Chicago.*, 405-723.
- Werren, J.H., Baldo, L., Clark, M.E., 2008. Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology* 6, 741-751.
- Wevers, D., Leendertz, F.H., Scuda, N., Boesch, C., Robbins, M.M., Head, J., Ludwig, C., Kühn, J., Ehlers, B., 2010. A novel adenovirus of Western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*). *Virology journal* 7, 1.
- Whitney, E., 1964. Flanders Strain, an Arbovirus newly isolated from Mosquitoes and Birds of New York State. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 13, 123-131.
- Wibbelt, G., Moore, M.S., Schountz, T., Voigt, C.C., 2010. Emerging diseases in Chiroptera: why bats? *Biology letters* 6, 438-440.
- Wilkinson, D.A., Duron, O., Cordonin, C., Gomard, Y., Ramasindrazana, B., Mavingui, P., Goodman, S.M., Tortosa, P., 2016. The bacteriome of bat flies (Nycteribiidae) from the Malagasy region: a community shaped by host ecology, bacterial transmission mode, and host-vector specificity. *Applied and environmental microbiology* 82, 1778-1788.
- Williams, K.P., Sobral, B.W., Dickerman, A.W., 2007. A robust species tree for the alphaproteobacteria. *Journal of bacteriology* 189, 4578-4586.
- Williams, M.C., Simpson, D.I.H., C., S., 1964. Bats and arboviruses in East Africa. *Nature* 203.
- Williams, R.A.J., Vazquez, A., Asante, I., Bonney, K., Odoom, S., Puplampu, N., Ampofo, W., Sanchez-Seco, M.P., Tenorio, A., Peterson, A.T., 2011. Yaoundé-like virus in resident wild bird, Ghana. *African Journal of Microbiology Research* 6, 19966-19969.
- Wirth, W.W., 1980. The biting midges of the Batu caves, Malaysia (Diptera : *Ceratopogoniade*). *Pacific Insects* 21, 304-307.
- Wong, S., Lau, S., Woo, P., Yuen, K.Y., 2006. Bats as a continuing source of emerging infections in humans. *Rev. Med. Virol.* in press.
- Yang, X., Thannhauser, T., Burrows, M., Cox-Foster, D., Gildow, F.E., Gray, S.M., 2008. Coupling genetics and proteomics to identify aphid proteins associated with vector-specific transmission of polerovirus (Luteoviridae). *Journal of virology* 82, 291-299.
- Yeates, D.K., Wiegmann, B.M., 1999. Congruence and controversy: toward a higher-level phylogeny of Diptera. *Annu Rev Entomol* 44, 397-428.
- Zeledon, R., Rosabal, R., 1969. *Trypanosoma Leonidasdeanei* sp. nov. in insectivorous bats of Costa Rica *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 63, 221-&.
- Zhang, H., Yang, X., Li, G., 1998. [Detection of dengue virus genome RNA in some kinds of animals caught from dengue fever endemic areas in Hainan Island with reverse transcription-polymerase chain reaction]. *Zhonghua shi yan he lin chuang bing du xue za zhi= Zhonghua shiyan he lincuang bingduxue zazhi= Chinese journal of experimental and clinical virology* 12, 226-228.
- Zirkel, F., Roth, H., Kurth, A., Drosten, C., Ziebuhr, J., Junglen, S., 2013. Identification and characterization of genetically divergent members of the newly established family Mesoniviridae. *Journal of virology* 87, 6346-6358.

## Annexes

### **Annexe 1** : Protocole de montage entre lames et lamelles des diptères

1. Tremper le diptère dans la potasse à froid pendant 2H.
2. Rincer de 5 à 7 fois dans de l'eau.
3. Tremper dans du liquide de Marc-André à froid pendant une nuit.
4. Rincer à l'eau pendant une nuit en 1 fois ou 2 fois en journée.
5. Déshydrater 20min à l'alcool à 70°.
6. Déshydrater 20min à l'alcool à 90°.
7. Déshydrater 20min à l'alcool absolu.
8. Tremper dans la créosote pendant une nuit.
9. Monter dans l'Euparal entre lame et lamelle.

## Annexe 2 : Protocole d'extraction d'ADN par le kit commercial *QIAGEN DNeasy®*

### *Blood and Tissue*

## Protocole DNeasy pour tissus animaux

### Remarques préliminaires importantes

- Si vous utilisez le kit DNeasy Tissue pour la première fois, veuillez vous référer à la partie "Technical Information" au DNeasy Tissue Kit Handbook.
- Les tampons ATL et AL\* peuvent former des précipités au cours de leur conservation. Si nécessaire, dissoudre les précipités en incubant le tampon à 55°C.
- Les tampons AW1\* et AW2† sont fournis sous forme concentrée. Avant la première utilisation, ajouter le volume approprié d'éthanol (96 à 100%), comme indiqué sur le flacon.
- Préchauffer un bain-marie à agitation à 55°C pour l'étape 2 et un autre bain-marie ou un bloc chauffant à 70°C pour l'étape 3.
- Si vous utilisez du matériel congelé, amener l'échantillon à température ambiante.
- Pour purifier l'ADN à partir de tissus fixés, vous référer aux "Protocoles pour la préparation et la lyse de différents types d'échantillons" (page 14).
- Les centrifugations seront réalisées à  $\geq 6000 \times g$  à température ambiante.
- Mélanger en vortexant par impulsion de 5 à 10 secondes.
- L'utilisation de la RNase A est facultative. La RNase A n'est pas fournie dans le kit DNeasy Tissue (se référer à "Copurification of RNA" au DNeasy Tissue Kit Handbook).

#### 1. Couper jusqu'à 25 mg de tissu (jusqu'à 10 mg de rate) en petits morceaux, les placer dans un tube de 1,5 ml et ajouter 180 µl de tampon ATL.

Vérifier que la quantité de prise d'essai soit correcte (voir à la page 8 du Handbook). Pour les tissus comme la rate avec un nombre de cellules très élevé par rapport à la masse, ne pas utiliser plus de 10 mg de prise d'essai.

Il est recommandé de couper le tissu en petits morceaux pour assurer une lyse plus efficace.

#### 2. Ajouter 20 µl de Protéinase K, mélanger en vortexant et incuber à 55°C jusqu'à la lyse complète du tissu. Vortexer de temps à autre au cours de l'incubation pour homogénéiser l'échantillon ou le placer dans un bain-marie à agitation ou sur un système équivalent.

La durée de la lyse varie selon le type de tissu traité. Elle est généralement complète après 1 à 3 h. Il est possible de la prolonger toute une nuit sans que la préparation en soit affectée.

\* Contient des sels chaotropiques qui sont des agents nocifs et irritants. Suivre les mesures appropriées de sécurité en laboratoire et porter des gants et des lunettes pendant l'utilisation du kit. N'est pas compatible avec des produits désinfectants contenant de l'eau de javel.

† Contient de l'azide de sodium comme agent de conservation. L'azide de sodium est fortement toxique et peut réagir de façon explosive au contact de conduites en plomb et en cuivre. Pour éliminer les solutions, procéder selon la réglementation en vigueur dans votre laboratoire.



Après incubation, le lysat peut être visqueux mais ne doit pas être gélatineux, ceci pouvant obstruer la colonne DNeasy. Si le lysat est très gélatineux, se référer au "Troubleshooting Guide" au DNeasy Tissue Kit Handbook.

**Facultatif : traitement de l'échantillon avec la RNase. Ajouter 4 µl de RNase A (100 mg/ml : se référer à "Ordering information" au DNeasy Tissue Kit Handbook), mélanger en vortexant et incubé 2 min à température ambiante.**

Les tissus en transcription active, tels le foie et les reins, contiennent beaucoup d'ARN qui seront copurifiés avec l'ADN génomique. Suivre cette étape facultative si vous souhaitez obtenir de l'ADN génomique exempt d'ARN. Si des résidus d'ARN ne risquent pas d'affecter les applications en aval, supprimer cette étape et continuer à l'étape 3.

- 3. Vortexer 15 sec. Ajouter 200 µl de tampon AL à l'échantillon, mélanger vigoureusement en vortexant et incubé 10 min à 70°C.**

Il est essentiel de bien mélanger immédiatement l'échantillon et le tampon AL en vortexant ou pipetant afin d'obtenir une solution homogène.

Un précipité blanc peut se former après addition du tampon AL. Il se dissout la plupart du temps pendant l'incubation à 70°C. Ce précipité n'affecte pas la procédure DNeasy. Certains types de tissu (par exemple la rate ou le tissu pulmonaire) peuvent former des lysats gélatineux après addition du tampon AL. Dans ce cas, il est recommandé de mélanger vigoureusement la préparation ou de la vortexer avant d'ajouter l'éthanol à l'étape 4.

- 4. Ajouter 200 µl d'éthanol (96 à 100%) à l'échantillon et mélanger en vortexant.**

Il est important de mélanger vigoureusement l'échantillon, le tampon AL et l'éthanol afin d'obtenir une solution homogène.

Un précipité blanc peut se former après addition de l'éthanol. Il est essentiel de le déposer entièrement dans la colonne DNeasy.

- 5. Déposer le mélange de l'étape 4 dans la colonne DNeasy placée dans un tube collecteur de 2 ml (fourni). Centrifuger 1 min à  $\geq 6000 \times g$  (8000 rpm). Jeter l'effluent et le tube collecteur.**
- 6. Placer la colonne DNeasy dans un nouveau tube collecteur de 2 ml (fourni), ajouter 500 µl de tampon AW1 et centrifuger 1 min à  $\geq 6000 \times g$  (8000 rpm). Jeter l'effluent et le tube collecteur.**

- 7. Placer la colonne DNeasy dans un tube collecteur de 2 ml (fourni), ajouter 500 µl de tampon AW2 et centrifuger 3 min à vitesse maximale afin de sécher la membrane DNeasy. Jeter l'effluent et le tube collecteur.**

Cette centrifugation permet d'éviter de contaminer l'éluat par des résidus d'éthanol. Jeter l'effluent et le tube collecteur.

Après centrifugation, sortir avec précaution la colonne DNeasy du tube collecteur afin que la colonne ne touche pas l'effluent. Ceci permet d'éviter une contamination par de l'éthanol (en cas de contamination, vider le tube collecteur et le réutiliser pour centrifuger à nouveau la colonne DNeasy 1 min à vitesse maximale).

- 8. Placer la colonne DNeasy dans un tube propre de 1,5 ml ou de 2 ml (non fourni) et l'éluer en déposant 200 µl de tampon AE directement sur la membrane DNeasy. Incuber 1 min à température ambiante et centrifuger 1 min à  $\geq 6000 \times g$  (8000 rpm).**

L'élution avec un volume de 100 µl (au lieu de 200 µl) augmente la concentration finale en ADN dans l'éluat, mais réduit également le rendement total (voir en figure 3 au DNeasy Tissue Kit Handbook).

- 9. Répéter l'élution comme décrit à l'étape 8.**

Il est possible d'utiliser un nouveau tube pour la deuxième étape d'élution afin d'éviter une dilution du premier éluat. Comme alternative, afin de mélanger les deux éluats, réutiliser le tube de l'étape 8 pour la deuxième étape d'élution.

**Remarque :** Ne pas éluer avec plus de 200 µl par tube de 1,5 ml car la colonne DNeasy peut entrer en contact avec l'éluat.

**Annexe 3** : Protocole de PCR *Cytochrome b*

**Protocole PCR CytB premier tour  
(Taille attendue : 950pb)**

Volumes en  $\mu\text{L}$

	1	60
Mix PCR	12,5	750
Sol Q	2,5	150
DW2/F(10 $\mu\text{M}$ )	0,2	12
DW4/R(10 $\mu\text{M}$ )	0,2	12
H2O	5,6	336

95°C	15min	
94°C	30sec	
60°C	1min 30sec	35X
72°C	1min 30sec	
72°C	10min	
10°C	$\infty$	

ADN	4 $\mu\text{L}$
Volume final	25 $\mu\text{L}$

**Protocole PCR CytB deuxième tour  
(Taille attendue : 950pb)**

Volumes en  $\mu\text{L}$

	1	60
TP 10X	2,5	150
MgCl <sub>2</sub> (50 $\mu\text{M}$ )	1,25	75
dNTPs (25mM)	2,5	150
CytB/F	1,25	75
CytB/R	1,25	75
H2O	15,15	909
Taq	0,1	6

95°C	5min	
94°C	30sec	
45°C	30sec	35X
72°C	1min 30sec	
72°C	10min	
10°C	$\infty$	

Amplicon	4 $\mu\text{L}$
Volume final	25 $\mu\text{L}$

## Annexe 4 : Extraction automatique d'ARNs au QIAcube

# QIAcube | Protocol Sheet

## General Information (April 2010)

<b>Application</b>	Virus
<b>Kit</b>	QIAamp® Viral RNA Mini Kit plus QIAamp Viral RNA Mini Accessory Set, cat. no. 1048147
<b>Sample material</b>	Body fluid
<b>Short protocol name</b>	Standard
<b>Version</b>	2
<b>Full protocol name</b>	Purification of viral RNA from cell-free body fluids
<b>Editable parameters</b>	Elution volume: 50–100 µl in increments of 5 µl; default 60 µl
<b>Required QIAcube® software versions</b>	Firmware version FIW-50-001-J_FW_MB.hex and PLC program version FIW-50-002-G-PLC_MB.prs or higher; available from the QIAcube Web Portal

## Shaker

<b>Material</b>	140 µl cell-free body fluids
<b>Vessel</b>	2 ml screw-cap tubes without skirted base* (use in combination with Shaker Rack Plugs)
<b>Adapter</b>	Shaker adapter for 2 ml screw-cap tubes (marked with "S2")

\* Sample Tubes CB, 2 ml (cat. no. 990382); see [www.qiagen.com/MyQIAcube](http://www.qiagen.com/MyQIAcube).

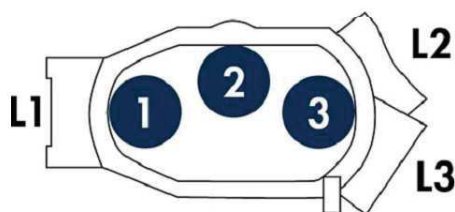
## Disposable Tips

Disposable Filter-Tips, 1000 µl

## Reagent Bottle Rack

Rack labeling strip QIAamp Viral RNA

## Rotor Adapter



## Position Reagent

Position	Reagent
1	Buffer AVL
2	100% ethanol
3	Buffer AW1
4	Buffer AW2
5	–
6	–

Position	Labware	Lid position
1	QIAamp Mini spin column	L1
2	–	–
3	1.5 ml collection tube†	L3

† Sarstedt, Micro tube 1.5 ml Safety Cap (see [www.sarstedt.com](http://www.sarstedt.com)).





# QIAcube | Protocol Sheet

## Microcentrifuge Tube Slots

	Position		
	A	B	C
<b>Content</b>	-	Buffer AVE	Diluted carrier RNA
<b>Vessel</b>		2 ml screw-cap tube without skirted base <sup>†</sup>	2 ml screw-cap tube without skirted base <sup>†</sup>

<sup>†</sup> Sample Tubes CB, 2 ml (cat. no. 990382); see [www.qiagen.com/MyQIAcube](http://www.qiagen.com/MyQIAcube).

Number of samples	Volume of reagent required for the indicated number of samples (µl)	
	-	
	<b>Buffer AVE</b>	<b>Diluted carrier RNA</b>
2	256	125 (28 carrier RNA + 97 Buffer AVE)
3	364	150 (33.6 carrier RNA + 116.4 Buffer AVE)
4	472	175 (39.2 carrier RNA + 135.8 Buffer AVE)
5	580	200 (44.8 carrier RNA + 155.2 Buffer AVE)
6	688	225 (50.4 carrier RNA + 174.6 Buffer AVE)
7	796	250 (56 carrier RNA + 194 Buffer AVE)
8	904	275 (61.6 carrier RNA + 213.4 Buffer AVE)
9	1012	300 (67.2 carrier RNA + 232.8 Buffer AVE)
10	1120	325 (72.8 carrier RNA + 252.2 Buffer AVE)
12	1336	375 (84 carrier RNA + 291 Buffer AVE)

## Comments

### Things to do before starting

In this protocol, carrier RNA must be diluted to a volume of 25 µl per sample in Buffer AVE. You must prepare carrier RNA for the required number of samples plus three additional samples (e.g., for 7 samples, prepare carrier RNA for 10 samples). Prepare 25 µl carrier RNA as described below.

No internal control	With internal control
Carrier RNA: 5.6 µl	Carrier RNA: 5.6 µl
Buffer AVE: 19.4 µl	Internal control: Up to 19.4 µl (if <19.4 µl internal control is used, adjust final volume to 25 µl with Buffer AVE).

Trademarks: QIAGEN®, QIAamp®, QIAcube® (QIAGEN Group).  
© 2007–2010 QIAGEN, all rights reserved.



Sample & Assay Technologies

## Annexe 5 : Traitement d'ARNs à la DNase

### DNase I Treatment

1. DNase I treatment uses the **TURBO DNA-free™ Kit** (Ambion, Cat #AM1907). Add the following to the purified RNA:

<b>TURBO DNaseI</b> (2U/μL)	1 μL
<b>10X TURBO DNase Buffer</b>	3 μL
<b>DEPC-treated water</b>	1 μL

Gently mix the tube and briefly centrifuge.

2. Incubate the reaction at **37°C** for **30 minutes**.

3. Add **5 μL DNase Inactivation Reagent** and mix well.

4. Incubate at room temperature for **two minutes**.

5. Centrifuge for **90 seconds at ≥10,000 x g** to pellet the DNase Inactivation Reagent.

6. Transfer **20 μL** of the supernatant to a new tube, while making sure that the pellet at the bottom of the tube is not disturbed.

**Annexe 6** : Quantification d'ARNs au *Qubit® RNA HS Assay*

1. Set up 2 Assay Tubes for the standards and 1 tube for each user sample.
2. Prepare Qubit® Working Solution by diluting the Qubit® RNA Reagent 1:200 in Qubit® RNA Buffer. Prepare 200 µL of Working Solution for each standard and sample.
3. Prepare the Assay Tubes (use 0.5-mL PCR tubes) according to the following table.

Volume	Standards	Samples
Working Solution (from step 2)	190 µL	180–199 µL
Standard (from kit)	10 µL	—
User Sample	—	1–20 µL
Total in each Assay Tube	200 µL	200 µL



4. Vortex standards and samples for 2–3 seconds and incubate at room temperature for 2 minutes.
5. Select RNA Assay on the Qubit® 2.0 Fluorometer to calibrate with standards and read the samples.



## Annexe 7 : Préparation de bibliothèques avec le kit *NEBNext® Ultra™* (Illumina®)

### Protocol:


#### Symbols

-  This caution sign signifies a step in the protocol that has multiple paths leading to the same end point but is dependent on a user variable, like the amount of input DNA.
-  Colored bullets indicate the cap color of the reagent to be added to a reaction.

**Starting Material:** 5 ng–1 µg fragmented DNA.


#### 1.1 NEBNext End Prep

1. Mix the following components in a sterile nuclease-free tube:





 (green) End Prep Enzyme Mix	3.0 µl
 (green) End Repair Reaction Buffer (10X)	6.5 µl
Fragmented DNA	55.5 µl
<hr/>	
Total volume	65 µl

2. Mix by pipetting followed by a quick spin to collect all liquid from the sides of the tube.
3. Place in a thermocycler, with the heated lid on, and run the following program:
  - 30 minutes @ 20°C
  - 30 minutes @ 65°C
  - Hold at 4°C

#### 1.2 Adaptor Ligation

-  If DNA input is < 100 ng, dilute the NEBNext Adaptor for Illumina (provided at 15 µM) 10-fold in 10 mM Tris-HCl or 10 mM Tris-HCl with 10 mM NaCl to a final concentration of 1.5 µM, use immediately.

1. Add the following components directly to the End Prep reaction mixture and mix well:

 (red) Blunt/TA Ligase Master Mix	15 µl
 (red) NEBNext Adaptor for Illumina*	 2.5 µl
 (red) Ligation Enhancer	1 µl
<hr/>	
Total volume	83.5 µl

\*The NEBNext adaptor is provided in NEBNext Singleplex (NEB #E7350) or Multiplex (NEB #E7335, #E7500, #E7710, #E7730, #E7600, #E6609) Oligos for Illumina.

2. Mix by pipetting followed by a quick spin to collect all liquid from the sides of the tube.
3. Incubate at 20°C for 15 minutes in a thermal cycler.
4. Add 3 µl of ● (red) USER™ Enzyme to the ligation mixture from Step 3.

**Note: This step is only required for use with NEBNext Adaptors. USER enzyme can be found in the NEBNext Singleplex (NEB #E7350) or Multiplex (NEB #E7335, #E7500, #E7710, #E7730, #E7600 and #E6609) Oligos for Illumina.**

5. Mix well and incubate at 37°C for 15 minutes.



***A precipitate can form upon thawing of the NEBNext Q5 Hot Start HiFi PCR Master Mix. To ensure optimal performance, place the master mix at room temperature while performing size selection/cleanup of adaptor-ligated DNA. Once thawed, gently mix by inverting the tube several times.***

### 1.3 Size Selection or Cleanup of Adaptor-ligated DNA



***Size selection is optional. If the starting material is greater than 50 ng, follow the protocol for size selection in Section 1.3A. For input less than 50 ng, size selection is not recommended. Follow the protocol for cleanup without size selection in Section 1.3B.***

#### 1.3A Size Selection of Adaptor Ligated DNA



***The following size selection protocol is for libraries with 200 bp inserts only. For libraries with different size fragment inserts, refer to Table 1.1 for the appropriate volume of beads to be added. The size selection protocol is based on a starting volume of 100 µl.***

1. Vortex AMPure XP Beads to resuspend.
2. Add 13.5 µl dH<sub>2</sub>O to the ligation reaction for a 100 µl total volume.
3. Add 55 µl of resuspended AMPure XP Beads to the 100 µl ligation reaction. Mix well by pipetting up and down at least 10 times.
4. Incubate for 5 minutes at room temperature.
5. Quickly spin the tube and place the tube on an appropriate magnetic stand to separate the beads from the supernatant. After the solution is clear (about 5 minutes), carefully transfer the supernatant containing your DNA to a new tube (**Caution: do not discard the supernatant**). Discard the beads that contain the unwanted large fragments.
6. Add 25 µl resuspended AMPure XP Beads to the supernatant, mix well and incubate for 5 minutes at room temperature.

7. Quickly spin the tube and place it on an appropriate magnetic stand to separate the beads from the supernatant. After the solution is clear (about 5 minutes), carefully remove and discard the supernatant that contains unwanted DNA. Be careful not to disturb the beads that contain the desired DNA targets (**Caution: do not discard beads**).
8. Add 200  $\mu$ l of 80% freshly prepared ethanol to the tube while in the magnetic stand. Incubate at room temperature for 30 seconds, and then carefully remove and discard the supernatant.
9. Repeat Step 8 once.
10. Air dry the beads for 5 minutes while the tube is on the magnetic stand with the lid open.  
**Caution: Do not overdry the beads. This may result in lower recovery of DNA target.**
11. Remove the tube/plate from the magnet. Elute the DNA target from the beads into 17  $\mu$ l of 10 mM Tris-HCl or 0.1 X TE. Mix well on a vortex mixer or by pipetting up and down. Incubate for 2 minutes at room temperature.
12. Quickly spin the tube and place it on a magnetic stand. After the solution is clear (about 5 minutes), transfer 15  $\mu$ l to a new PCR tube for amplification.
13. Proceed to PCR Amplification in Section 1.4.

Table 1.1: Recommended conditions for bead based size selection.

LIBRARY PARAMETERS	APPROXIMATE INSERT SIZE	150 bp	200 bp	250 bp	300-400 bp	400-500 bp	500-700 bp
	Total Library Size (insert + adaptor)	270 bp	320 bp	400 bp	400-500 bp	500-600 bp	600-800 bp
VOLUME TO BE ADDED ( $\mu$ l)	1st Bead Selection	65	55	45	40	35	30
	2nd Bead Selection	25	25	25	20	15	15



### 1.3B Cleanup of Adaptor-ligated DNA without Size Selection

1. Vortex AMPure XP Beads to resuspend
2. Add 86.5  $\mu$ l resuspended AMPure XP Beads to the ligation reaction. Mix well by pipetting up and down at least 10 times.
3. Incubate for 5 minutes at room temperature.
4. Quickly spin the tube and place it on an appropriate magnetic stand to separate beads from supernatant. After the solution is clear (about 5 minutes), carefully remove and discard the supernatant. Be careful not to disturb the beads that contain DNA targets (**Caution: do not discard beads**).
5. Add 200  $\mu$ l of 80% freshly prepared ethanol to the tube while in the magnetic stand. Incubate at room temperature for 30 seconds, and then carefully remove and discard the supernatant.
6. Repeat Step 5 once.
7. Air dry the beads for 5 minutes while the tube is on the magnetic stand with the lid open.

**Caution: Do not overdry the beads. This may result in lower recovery of DNA target.**

8. Remove the tube/plate from the magnet. Elute the DNA target from the beads by adding 17  $\mu$ l of 10 mM Tris-HCl or 0.1X TE.
9. Mix well by pipetting up and down, or on a vortex mixer. Incubate for 2 minutes at room temperature.
10. Quickly spin the tube and place it on the magnetic stand.
11. After the solution is clear (about 5 minutes), transfer 15  $\mu$ l to a new PCR tube for amplification.

## 1.4 PCR Enrichment of Adaptor Ligated DNA



Follow Section 1.4A if you are using the following oligos (10  $\mu$ M primer):

**NEBNext Singleplex Oligos for Illumina (NEB #E7350)**

**NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (Set 1, NEB #E7335)**

**NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (Set 2, NEB #E7500)**

**NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (Set 3, NEB #E7710)**

**NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (Set 4, NEB #E7730)**

**NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (Dual Index Primers, NEB #E7600)**

Follow Section 1.4B if you are using NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (96 Index Primers, NEB #E6609).

### 1.4A PCR Amplification

1. Mix the following components in sterile strip tubes:

Adaptor Ligated DNA Fragments	15 $\mu$ l
● (blue) NEBNext Q5 Hot Start HiFi PCR Master Mix	25 $\mu$ l
● (blue) Index Primer/i7 Primer*,**	5 $\mu$ l
● (blue) Universal PCR Primer/i5 Primer*,***	5 $\mu$ l
<hr/>	
Total volume	50 $\mu$ l

\* The primers are provided in NEBNext Singleplex (NEB #E7350) or Multiplex (NEB #E7335, #E7500, #E7710, #E7730, #E7600) Oligos for Illumina. For use with Dual Index Primers (NEB #E7600), look at the NEB #E7600 manual for valid barcode combinations and tips for setting up PCR reactions.

\*\* For use with NEBNext Multiplex Oligos (NEB #E7335, #E7500, #E7710 or #E7730) use only one index primer per PCR reaction. For use with Dual Index Primers (NEB #E7600) use only one i7 primer per reaction.

\*\*\* For use with Dual Index Primers (NEB #E7600) use only one i5 Primer per reaction.

2. PCR cycling conditions:

CYCLE STEP	TEMP	TIME	CYCLES
Initial Denaturation	98°C	30 seconds	1
Denaturation	98°C	10 seconds	4–12*
Annealing/Extension	65°C	75 seconds	
Final Extension	65°C	5 minutes	1
Hold	4°C	$\infty$	

\*We suggest 4 PCR cycles for 1  $\mu$ g DNA input 7-8 cycles for 50 ng, and 12 for 5 ng DNA input. Further optimization of PCR cycle number may be required.

3. Proceed to Cleanup of PCR Amplification in Section 1.5.

### 1.4B PCR Amplification for use with NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (96 Index Primers, NEB #E6609)

- Mix the following components in sterile strip tubes:

Adaptor Ligated DNA Fragments	15 $\mu$ l
● (blue) Index/ Universal Primer Mix*	10 $\mu$ l
● (blue) NEBNext Q5 Hot Start HiFi PCR Master Mix	25 $\mu$ l
<hr/>	
Total volume	50 $\mu$ l

\* The primers are provided in NEBNext Multiplex Oligos for Illumina; NEB #E6609. Please refer to the NEB #E6609 manual for valid barcode combinations and tips for setting up PCR reactions.

- PCR cycling conditions:

CYCLE STEP	TEMP	TIME	CYCLES
Initial Denaturation	98°C	30 seconds	1
Denaturation	98°C	10 seconds	4–12*
Annealing/Extension	65°C	75 seconds	
Final Extension	65°C	5 minutes	1
Hold	4°C	$\infty$	

\* We suggest 4 PCR cycles for 1  $\mu$ g DNA input 7-8 cycles for 50 ng, and 12 for 5 ng DNA input. Further optimization of PCR cycle number may be required.

- Proceed to Cleanup of PCR Amplification in Section 1.5

## 1.5 Cleanup of PCR Amplification

1. Vortex AMPure XP Beads to resuspend.
2. Add 45  $\mu$ l of resuspended AMPure XP Beads to the PCR reactions (~ 50  $\mu$ l). Mix well by pipetting up and down at least 10 times.
3. Incubate for 5 minutes at room temperature.
4. Quickly spin the tube and place it on an appropriate magnetic stand to separate beads from supernatant. After the solution is clear (about 5 minutes), carefully remove and discard the supernatant. Be careful not to disturb the beads that contain DNA targets (**Caution do not discard beads**).
5. Add 200  $\mu$ l of 80% ethanol to the PCR plate while in the magnetic stand. Incubate at room temperature for 30 seconds, and then carefully remove and discard the supernatant.
6. Repeat Step 5 once.
7. Air dry the beads for 5 minutes while the PCR plate is on the magnetic stand with the lid open.

**Caution: Do not overdry the beads. This may result in lower recovery of DNA target.**

8. Remove the tube/plate from the magnet. Elute DNA target from beads into 33  $\mu$ l 0.1X TE. Mix well by pipetting up and down at least 10 times. Quickly spin the tube and incubate at room temperature for 2 minutes.
9. Place the sample on an appropriate magnetic stand to separate beads from supernatant. After the solution is clear (about 5 minutes), carefully transfer 28  $\mu$ l supernatant to a new PCR tube. Libraries can be stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .
10. Dilute 2-3  $\mu$ l of the library 5 fold with 10 mM Tris-HCl or 0.1X TE and check the size distribution on an Agilent Bioanalyzer<sup>®</sup> (high sensitivity chip).



**Annexe 8** : Valorisations, contributions et collaborations diverses**Articles**

1.Duron, O., Schneppat, U. E., Berthomieu, A., Goodman, S. M., Droz, B., Paupy, C., **Obame-Nkoghe, J.**, Rahola, N., Tortosa, P. (2014). **Origin, acquisition and diversification of heritable bacterial endosymbionts in louse flies and bat flies.** *Molecular ecology*, 23(8), 2105-2117.

2.Maganga, G. D., Bourgarel, M., **Nkoghe, J. O.**, N'Dilimabaka, N., Drosten, C., Paupy, C., ... & Leroy, E. M. (2014). **Identification of an unclassified paramyxovirus in *Coleura afra*: a potential case of host specificity.** *PloS one*, 9(12), e115588.

3.Rahola, N., Henni, L. H., **Obame, J.**, Ayala, D., Makanga, B. K., Lehrter, V., ... & Depaquit, J. (2016). **A molecular study of the genus *Spelaeomyia* (Diptera: Phlebotominae) with description of the male of *Spelaeomyia moucheti*.** *Parasites & Vectors*, 9(1), 367.

4.Bitome Essono P. Y.<sup>1,2,3\*</sup>, Ollomo B. <sup>2\*</sup>, Arnathau C.<sup>4</sup>, Moukodoum N. D. <sup>2</sup>, Yacka Moubela L. <sup>2</sup>, Okouga A. P. <sup>2</sup>, Boudenga L. <sup>2</sup>, Mve Ondo B. <sup>2</sup>, **Obame-Nkoghe J.** <sup>2</sup>, Mbeang Nguema P. <sup>2,3</sup>, Njokou F. <sup>5</sup>, Makanga B. <sup>2,3</sup>, Watter R. <sup>1</sup>, Ayala D. <sup>2,4</sup>, Renaud F. <sup>4</sup>, Rougeron V. <sup>2,4</sup>, Bretagnolle F. <sup>1\*</sup>, Prugnolle F. <sup>2,4\*</sup>, Paupy C. <sup>2,4\*</sup>. **Screening wildlife pathogen biodiversity using hematophagous flies as "flying syringes"**. soumis à *eLife Sciences*

### Articles de vulgarisation

1. **Obame-Nkoghe J.**, Rahola N., Paupy C. (2014). **A la découverte de la biodiversité des arthropodes hématophages peuplant les cavités souterraines du Gabon.** *Carrefour Sciences* N°008 - Juin 2014

2. Rahola N., Ayala D. **Obame-Nkoghe J.**, Makanga B., Paupy C. (2016). **Biodiversité des insectes vecteurs au Gabon : une histoire sans fin.** *Carrefour Sciences* N°011 - Août 2016.

### Poster

**Obame-Nkoghe J.**, Rahola N., Bourgarel M., Yangari P., Leroy E. M., Fontenille D., Paupy C. (2013). **Caractérisation de l'entomofaune hématophage cavernicole du Gabon et implication dans la transmission d'agents infectieux.** *Assemblée Générale MIVEGEC-IRD 2013.*

### Autres

- Participation au projet de vulgarisation des grottes de la région de Lastoursville

[www.grottes-de-lastoursville.org](http://www.grottes-de-lastoursville.org)

- 12 heures d'enseignements : *Maladies à transmission vectorielle : paludisme et trypanosomiase humaine africaine.* Université des Sciences et Techniques de Masuku (USTM, Gabon)