

Concepts et méthodes d'identification des espèces d'arthropodes

Didier Fontenille, Lionel Almeras, Claire Garros

INTRODUCTION À LA RECONNAISSANCE DES ESPÈCES

En santé publique humaine et vétérinaire, en recherche, ou par simple curiosité naturaliste, il est important de savoir reconnaître les taxa (entités, unités taxonomiques) auxquels nous sommes confrontés, et en particulier l'espèce. Dans ce chapitre, nous considérerons l'espèce selon sa définition biologique en tant que communauté de reproduction.

De l'intérêt de l'identification

Identifier les espèces d'un système biologique d'intérêt est primordial pour la compréhension du fonctionnement de ce système. En effet, c'est par le nom unique de l'espèce que l'on a accès à d'autres informations comme le comportement, la distribution géographique, la susceptibilité aux insecticides ou le rôle épidémiologique de l'entité considérée. Dans le cas des maladies à transmission vectorielle, l'identification des espèces vectrices doit être aussi précise que possible. En effet, des espèces proches morphologiquement – voire des populations génétiquement différenciées d'une même espèce – peuvent présenter des différences écologiques ou biologiques importantes générant des rôles différents dans les cycles de transmission. Une mauvaise identification des espèces peut avoir des conséquences désastreuses lors de la mise en place des

stratégies de lutte antivectorielle ou lors de la surveillance d'espèces exotiques invasives (*Aedes albopictus*, *Ochlerotatus japonicus*, *Culicoides imicola*). Nous n'aborderons pas ici les niveaux supra-spécifiques (sous-genre, genre, famille), qui font l'objet de nombreux débats et de fréquentes remises en question. Le niveau de la sous-espèce, considérée ici comme une population, non encadrée par le Code international de la nomenclature zoologique (www.iczn.org), n'est pas traité dans ce chapitre. Pour mémoire, une population est constituée d'individus appartenant à la même espèce, en contact reproductif entre eux et adaptés à leur environnement. Une population est polymorphe par nature, mais les individus qui la composent partagent et échangent des caractères entre eux. Ces caractères sont morphologiques, morphométriques, comportementaux, génétiques, et souvent d'une grande importance en santé publique, par exemple l'anthropophilie, la compétence vectorielle ou encore la sensibilité aux insecticides. La caractérisation d'une population s'appuie donc sur les mêmes critères que la caractérisation d'une espèce, et la frontière est parfois ténue. Il faut donc toujours garder un regard critique et ne pas conclure trop rapidement, quels que soient les critères utilisés, soit à des espèces différentes (alors que c'est un polymorphisme populationnel), soit à la même espèce (alors que l'on est en présence d'un complexe d'espèces).

Le lecteur trouvera dans les chapitres correspondant aux familles de vecteurs les références des ouvrages et sites internet dédiés à la reconnaissance des espèces dans ces groupes.

Historiquement, et encore majoritairement à l'heure actuelle, les caractères utilisés pour rattacher un spécimen à une espèce sont morphologiques. Il peut être nécessaire de revenir à la description princeps de l'espèce. Dans les cas douteux, l'identification pourra être confirmée par confrontation avec le spécimen holotype, porteur du nom, déposé dans un musée lors de la description officielle. Ce type d'identification ne peut pas être réalisé en routine lors des collectes entomologiques, et l'identification s'appuie sur des clés d'identification morphologique où le diagnostic est différentiel entre les espèces d'une région ou d'un groupe. Les états de caractères diagnostiques de la clé doivent être fixés et spécifiques de l'espèce. Des traits autres que morphologiques peuvent être diagnostiques et sont parfois publiés dans les descriptions les plus récentes : patrons chromosomiques, séquences nucléotidiques, mesures morphométriques, empreintes protéiques (MALDI-TOF MS) ou spectres d'interférence optique. Les outils développés sur ces derniers traits peuvent d'ailleurs être préférés à l'identification morphologique, parfois trop difficile. Il n'existe pas d'autorité de validation des caractères spécifiques, ni même de la description d'espèces. Les revues scientifiques acceptent les articles décrivant de nouvelles espèces sur la bonne foi des auteurs et après avis d'experts relecteurs, qui eux-mêmes ne disposent pas toujours de l'ensemble des informations qui seraient nécessaires à une validation sans équivoque du statut de nouvelle espèce.

Sensibilité et spécificité de l'identification

Lorsque l'on identifie des espèces mal connues, rares, ou dans des régions peu étudiées, quelle que soit la technique d'identification utilisée, il faut toujours garder un esprit critique, et ne pas conclure trop hâtivement. On peut se

tromper pour de nombreuses raisons, dont les plus fréquentes sont listées ci-dessous.

- Certaines descriptions anciennes ont été faites alors que l'on ne connaissait pas la diversité biologique dans les taxa de rattachements (familles, genres) et que l'espèce était décrite à partir de peu de caractères, en général morphologiques.
- La description n'a pas toujours été faite par des spécialistes, et le descripteur a attribué à l'espèce des caractères non spécifiques (c'est-à-dire non fixés), voire inexacts.
- Si l'on s'appuie sur une liste d'espèces déjà signalées d'une région, cette liste peut être incomplète, soit parce que la faune était mal connue, soit parce qu'elle a évolué (disparition ou introduction de nouvelles espèces).
- L'espèce a pu être décrite sous plusieurs noms, souvent par plusieurs auteurs, qui n'avaient pas pu échanger entre eux. L'exemple le plus classique est celui du moustique le plus cosmopolite : *Culex (Cx.) pipiens* L., 1758, qui avait 75 synonymes (dont certains décrits par Linné lui-même !) incluant *Cx. quinquefasciatus* Say, 1923 (élevé au rang d'espèce en 1976), pour lequel les mises en synonymie n'ont probablement pas encore été toutes faites.
- Les personnes chargées de l'identification ne disposent pas toujours des plus récentes révisions (compléments de description, élévation de « sous-espèces » au rang d'espèce, synonymie...).
- L'espèce est polymorphe, morphologiquement et génétiquement, laissant croire que l'on est en présence de plusieurs espèces, mais l'étendue de ce polymorphisme intra-spécifique est mal appréciée.
- Inversement, alors que différents individus, apparemment similaires morphologiquement, voire génétiquement en fonction des marqueurs utilisés, semblent pouvoir être rattachés à la même espèce, ils appartiennent en fait à des espèces jumelles à l'intérieur de complexes d'espèces.

- Pour certaines espèces mal connues, l'ensemble des stades n'est pas encore décrit. Certaines espèces de moustiques, par exemple, ont seulement été décrites à partir de larves, ou d'adultes d'un seul sexe. Cela peut conduire à rattacher trop hâtivement un spécimen d'une espèce dont on ne possède qu'une description partielle à une autre espèce proche.

IDENTIFICATION MORPHOLOGIQUE

Pour des raisons historiques et techniques, l'identification morphologique reste la technique de référence. La première description de moustiques contemporains (pas les fossiles), au sens moderne du terme, c'est-à-dire permettant sa reconnaissance parmi d'autres taxa, a été faite par Linné : il s'agit de *Culex pipiens* de Suède décrit en 1758 (Linnaeus, 1758). *Aedes aegypti* a été décrit également par Linné, sous le nom de *Culex aegypti*, en 1762. Le Code international de nomenclature zoologique a un rôle de garant de la stabilité des noms scientifiques en définissant les règles d'élaboration et de priorité des noms scientifiques des organismes animaux et les conventions d'écriture des noms d'espèces et de leurs descripteurs.

L'identification morphologique d'un arthropode d'intérêt médical ou vétérinaire peut généralement se faire sur les différents stades, lorsque ceux-ci ont été décrits : œufs, larves, nymphes, adultes mâles ou femelles, sur l'individu entier, frais lors de collectes de terrain ; à sec ou conservé dans l'alcool si les identifications se font postérieurement aux collectes, et sur certains organes (armatures pharyngées, ailes, spermathèques, genitalia...).

Chez les espèces rarement capturées, certains stades restent non décrits, ou la description est imprécise. C'est le cas des œufs, qui sont rarement discriminants entre espèces, même si dans certains cas, comme chez les phlébotomes ou pour les anophèles du complexe *Maculipennis*, la taille, la forme ou l'ornementation du chorion permettent de reconnaître différentes espèces.

Chez de nombreuses espèces de *Culicoides*, les stades œufs, immatures et parfois le mâle restent inconnus. Ainsi, pour ces espèces encore peu connues, il est important de ne pas procéder à des identifications trop hâtives sur la base de l'observation d'un seul stade.

Conservation

De nombreuses techniques de préservation et de montage existent (voir chap. 4). Ces techniques dépendent des groupes de vecteurs (moustiques, tiques, glossines, phlébotomes, puces...) et de l'usage que l'on souhaite faire du spécimen : collection de référence (holotype, paratype, allotype, paedotype, néotype syntypes, etc.), analyses moléculaires, enseignement. Les stades aquatiques (par exemple larves et nymphes de moustiques ou de simulies), petits (par exemple phlébotomes adultes), ou qui se rétracteraient s'ils étaient conservés à sec (par exemple tiques) peuvent être conservés dans l'alcool (à 70°). Ce mode de préservation permet de les conserver sur de longues périodes à condition de contrôler l'absence d'évaporation d'alcool ou d'effectuer des ajouts d'alcool à 95° ; cependant, une altération des couleurs et éventuellement le détachement des soies sont fréquents. Évidemment, les spécimens en alcool doivent être parfaitement étiquetés (lieu, date, espèce, récolteur, déterminateur). Il est préférable de mettre l'étiquette, écrite au crayon papier, à l'intérieur du tube ou du flacon contenant le spécimen.

Seuls quelques groupes peuvent être conservés à sec, en général montés sur minuties, puis rangés dans des boîtes de collections. Dans tous les cas, les spécimens doivent être référencés dans une base de données (par exemple la collection ARIM, voir chap. 4).

Identification

L'identification morphologique des spécimens entiers (montés sur minuties ou aiguilles, ou conservés en alcool) se fait sous loupe binoculaire, à l'aide de clés d'identification dichotomique qui permettent de choisir entre plusieurs critères morphologiques. Ces clés sont en version papier ou sous forme électronique.

Certains vecteurs doivent être montés en entier entre lames et lamelles, après éclaircissement et parfois coloration. C'est le cas des puces, ou de stades préimaginaux de certaines familles.

Selon les familles de vecteurs, il est fréquent d'avoir à disséquer, monter entre lame et lamelle dans un milieu de montage (type Euparal), et observer à la loupe binoculaire ou au microscope des parties ou organes d'individus à identifier (genitalia des glossines ; genitalia mâles des moustiques ; ailes, spermathèques et armatures cibariales de phlébotomes, etc.). Un traitement du spécimen est souvent nécessaire (éclaircissement, coloration...). Pour les arthropodes qui laissent des mues (exuvies), comme les moustiques, il est parfois possible de faire l'identification sur ce matériel, en particulier lorsque des larves ont été mises en élevage jusqu'au stade adulte.

Parfois l'identification ne peut être réalisée qu'après observation de tissus particuliers dans un milieu adapté. C'est par exemple le cas des ovaires au stade semi-gravide d'anophèles pour réaliser des identifications d'espèces par cytogénétique à partir des chromosomes géants (polytènes). Les ovaires sont disséqués sur le terrain et préservés en liquide de Carnoy (acide acétique + alcool absolu), jusqu'à coloration au laboratoire. L'observation microscopique des chromosomes des glandes salivaires des larves de simulies permettent également l'identification.

Les critères morphologiques discriminants et les clés morphologiques d'identification

La plupart du temps, l'identification débute directement au niveau de la famille. En général, on sait par expérience que l'on a affaire à une tique, un phlébotome, une glossine, une puce ou un moustique. Mais, pour les personnes non averties, il peut être utile d'avoir des critères morphologiques de reconnaissance des familles et des sous-familles. On peut être conduit à se poser les questions suivantes : est-ce que cet insecte que je crois être un diptère est un Psychodidae, et pas un Culicidae ? Et en particulier

un Phlebotominae (phlébotome), et pas un Psychodinae ? Dans ce cas, est-ce un *Phlebotomus* ou un *Sergentomyia* ? Et finalement, à quelle espèce appartient mon spécimen ?

Selon son domaine de compétences, chacun s'interrogera devant des nymphes de chironomes trouvées dans une mare, des adultes de Cecidomyiidae capturés au piège lumineux, ou un Streblidae reçu dans un tube d'alcool.

Il existe des critères morphologiques spécifiques de chaque rang taxonomique. Ils concernent la taille globale et la taille de différents organes ou appendices, la présence et le nombre d'appendices, la couleur, la forme globale de différents « marqueurs », la présence de soies, d'écaillés, la présence de taches ou anneaux de couleur, etc. Il est impossible de lister ici l'ensemble de ces critères, qui permettent l'identification de plus de cinq millions d'espèces d'insectes et de dizaines de milliers d'acariens. Ces critères sont présentés dans les ouvrages dédiés à chacun de ces groupes, parfois par région, dont les références sont données dans les chapitres dédiés à ces groupes. Par exemple pour les moustiques, on se référera à HARBACH et KNIGHT (1980), pour les tiques à SONENSHINE (1991), pour les phlébotomes à ABONNENC (1972) ou LEVIS (1982), pour les triatomes à LENT et WYGODZINSKY (1979), pour les puces à HOPKINS et ROTHSCHILD (1953-1971) et SMIT (1973), etc.

À titre d'illustration, nous présentons deux exemples de ce type de clés morphologiques. Certaines clés se basent uniquement sur du texte (encadré 3.1), alors que d'autres intègrent des illustrations, fort appréciées pour l'identification (encadré 3.2).

Depuis, des clés d'identification informatisées ont été développées. Ces clés sont sur des sites internet (en ligne ou disponibles au téléchargement) en perpétuelle évolution. On les trouve à l'aide des moteurs de recherche (par exemple pour les culicoides : <http://www.iikculicoides.net/> ou <http://www.culicoides.net/taxonomy/identification-keys>).

Des cédéroms permettent également de réaliser les identifications lorsqu'il n'y a pas d'accès internet (par exemple celui sur les moustiques d'Europe

Encadré 3.1. Exemple d'une clé de détermination dichotomique utilisant uniquement du texte, à propos des larves de moustiques de stade IV à l'île de la Réunion, océan Indien (d'après BOUSSÈS et al., 2013).

1 Absence de siphon	2
• Présence de siphon	3
2 Soies clypéales antéro-internes (2-C) rapprochées ; soie antennaire 1-A à 4-9 brins ; soies antéro-externes (3-C) ramifiées en buisson	<i>Anopheles coustani</i>
• Soies clypéales antéro-internes (2-C) espacées ; soie antennaire 1-A simple ; soies antéro-externes (3-C) peu ramifiées	<i>Anopheles arabiensis</i>
3 Une seule paire de soies 1-S bien visible sur le siphon	4
• Plusieurs paires de soies 1-S sur le siphon, parfois peu visibles	8
4 Absence de peigne sur le siphon ; présence de plaques abdominales ; papilles anales très courtes et arrondies à leur extrémité	<i>Orthopodomyia reunionensis</i>
• Présence d'un peigne sur le siphon ; absence de plaques abdominales ; papilles anales plus longues et lancéolées	5
5 Antennes non spiculées ; absence de soies en avant de l'aire barrée	6
• Antennes spiculées ; présence de soies en avant de l'aire barrée	7
6 Peigne du segment VIII formé de dents spiniformes simples ; soies 4-X à simple brin	<i>Aedes albopictus</i>
• Peigne du segment VIII avec de fortes dentifications de chaque côté de la dent principale ; soies 4-X à double brins	<i>Aedes aegypti</i>
7 Tégument non spiculé et non vésiculé ; dents du peigne du siphon régulièrement espacées et n'atteignant pas l'implantation de la soie 1-S	<i>Aedes dufouri</i>
• Tégument spiculé (thorax-abdomen) et vésiculé (tête) ; dent apicale du peigne du siphon nettement écartée des autres et au-dessus de l'implantation de la soie 1-S	<i>Aedes fowleri</i>

(fig. 3.1). La plupart du temps, ces clés informatisées permettent d'accéder à l'identification par plusieurs critères (pattes, ailes, siphon, thorax, taille, localisation géographique...).

On peut également recourir aux analyses morphométriques. La morphométrie est l'étude des formes et tailles d'un objet, par exemple d'une aile d'insecte, et de leurs variations. Actuellement la méthode de choix est la morphométrie géométrique qui analyse la forme de manière indépendante de la taille. Les études morphométriques s'appuient sur des mesures entre points de référence ou coordonnées, traitées par des programmes informatiques (fig. 3.2). C'est un outil puissant, non seulement pour l'identification d'espèces, mais également pour les études de populations.

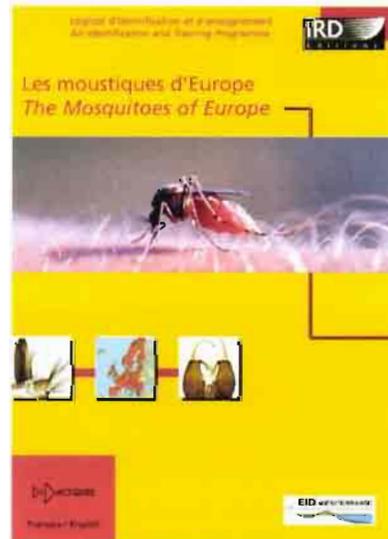
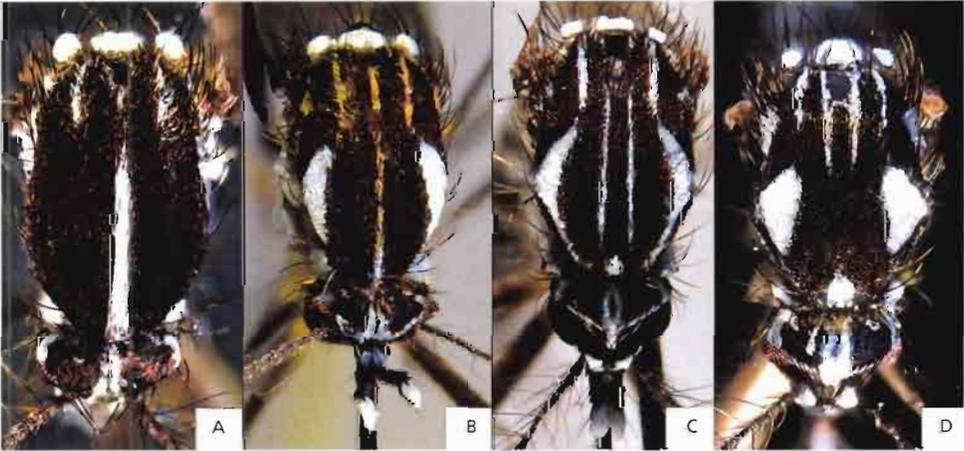


Figure 3.1 – Exemple d'un cédérom d'identification : les moustiques d'Europe.

Encadré 3.2. Exemple de clé de détermination dichotomique utilisant conjointement du texte et des illustrations, à propos des moustiques *Stegomyia* de Mayotte, océan Indien (d'après LE GOFF et al., 2013).

- 1 Scutum avec une unique ligne longitudinale médiane d'écailles blanches ou jaunes 2
 - Scutum avec une paire de lignes longitudinales submédianes 3
- 2 Scutum avec bande médio-longitudinale d'écailles blanches (photo A) *Stegomyia albopicta*
 - Scutum avec une étroite bande médio-longitudinale d'écailles jaunes (photo B) *Stegomyia pia*
- 3 Scutum avec deux bandes blanches en croissant de lune (ou en lyre) dont la partie postérieure est en prolongement de lignes d'écailles blanches (photo C) *Stegomyia aegypti*
 - Scutum avec deux larges taches triangulaires d'écailles blanches en position antéro-latérale ; scutum postérieur avec quatre fines rayures ordinairement blanches, parfois jaunâtres (photo D) *Stegomyia bromeliae*



Quatre *Stegomyia* (Mayotte).
© IRD/V. Robert

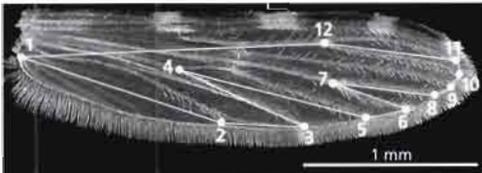


Figure 3.2 – Aile d'*Anopheles funestus* avec indication des points caractéristiques en morphométrie.

© IRD/D. Ayala

L'identification morphologique a ses avantages et ses limites (encadré 3.3). Elle requiert une intégrité des spécimens, qui peuvent être abîmés lors de leur collecte, de leur transport, de leur manipulation ou de leur conservation. Il peut y avoir des variations morphologiques mal connues à l'intérieur d'une espèce. C'est pourquoi l'identification morphologique doit être complétée, voire remplacée par d'autres méthodes présentées ci-dessous.

Encadré 3.3. Avantages et limites de l'identification morphologique.

Avantages

Depuis Linné, les types de références (holotype, paratype, allotype, paedotype, néotype, syntype, etc.) qui sont préservés en musée sont morphologiques. C'est à ces types que l'on doit se référer lorsqu'il y a un doute sur l'identification. Cependant, depuis le début des années 2000, toutes les nouvelles descriptions morphologiques sont complétées par une identification moléculaire, dont les séquences sont accessibles via les bases de données internationales.

L'identification morphologique ne nécessite que peu de moyens techniques, si ce n'est une bonne loupe et parfois un microscope.

C'est une méthode facile à mettre en œuvre sur le terrain, en particulier pour certains groupes (moustiques femelles, triatomés, tiques). Elle reste la moins onéreuse lorsque des milliers de spécimens, de moustiques par exemple, sont à déterminer.

Limites

Si l'on doit se référer à des spécimens de référence, il faut disposer de bonnes conditions de conservation et d'accès à ces sites de conservation (musées, laboratoires internationaux), ce qui n'est pas toujours le cas en zone tropicale.

Même si l'on dispose de clés détaillées et illustrées, il faut une bonne expérience pour identifier jusqu'au niveau spécifique, en particulier lorsque plusieurs dizaines d'espèces sont présentes dans la zone d'étude.

L'identification morphologique prend beaucoup de temps lorsque de très nombreux spécimens sont collectés, et particulièrement s'ils ne sont pas très bien conservés.

De nombreuses espèces présentent un polymorphisme morphologique, ou de couleur, qui peut faire douter de l'identification ou induire en erreur : par exemple, *Aedes aegypti* présente différentes « sous-espèces » appartenant toutes au taxon *aegypti* : *formosus*, *aegypti*, *queenslandensis*.

De nombreuses espèces sont morphologiquement identiques, appartenant à des complexes d'espèces, alors que ce sont bien des taxons différents (voir ci-dessous)

L'automatisation de l'identification morphologique, malgré les progrès de l'informatique et la reconnaissance de formes en 3D, n'est pas encore opérationnelle.

C'est en particulier nécessaire lorsque l'on est confronté à des complexes d'espèces. Dans ce cas, les outils moléculaires ou protéomiques sont indispensables.

IDENTIFICATION GÉNÉTIQUE

La cytogénétique

Avant le développement des tests d'identification moléculaire utilisant le polymorphisme de l'ADN pour différencier des espèces ou des populations, les techniques de cytogénétique ont été largement utilisées, notamment pour les espèces du genre *Anopheles*. L'analyse des profils

de bandes d'hétérochromatine des chromosomes s'est révélée extrêmement instructive, non seulement pour l'identification des espèces, la détermination de l'existence d'espèces jumelles, mais aussi dans l'analyse de la structure des populations. Les inversions chromosomiques observées sur les caryotypes peuvent être fixées pour tous les individus d'une espèce, ou pour certaines populations. Ces inversions peuvent donc constituer des marqueurs d'identification d'espèces ou de populations, notamment sur les chromosomes polytènes chez les moustiques du genre *Anopheles* : complexe *Maculipennis* (FRIZZI, 1953), complexe *Gambiae* (COLUZZI *et al.*, 2002), complexe *Culicifacies*, ou au sein

du complexe d'espèces *Simulium damnosum* comprenant au moins 9 cyto-espèces (POST *et al.*, 2011). L'identification par cytogénétique est aujourd'hui nettement moins employée, notamment en raison de la contrainte de travailler sur des stades de développement spécifiques frais, congelés ou fixés (glandes salivaires de larves de stade 4, ou cellules trophocytaires des ovaires de femelles semi-gravidés), limitant les études à large échelle. De plus, la préparation des chromosomes est longue et fastidieuse, et la lecture des bandes requiert une expertise approfondie (fig. 3.3).

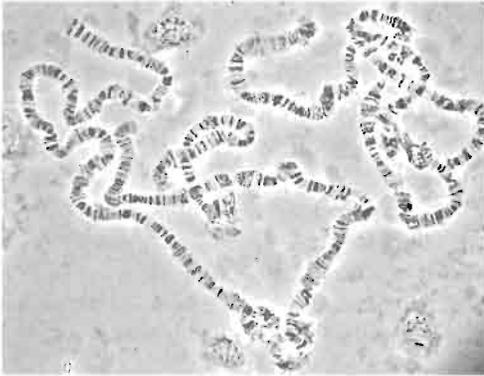


Figure 3.3 – Chromosomes polytènes d'*An. gambiae*.

© Université La Sapienza, Rome/M. Pombi

L'iso-enzymologie

Les méthodes iso-enzymatiques ont également été largement utilisées. Elles se basent sur la mobilité électrophorétique différentielle de certaines enzymes du fait de séquences d'acides aminés différentes. Les différentes formes alléliques sont appelées isoenzymes. Certains allèles s'avèrent spécifiques d'une espèce ou d'une population et peuvent être utilisés comme marqueur d'identification. Tout comme la méthode précédente, ces tests ont permis l'identification de nombreuses espèces jumelles au sein de complexes du genre *Anopheles* tels que les complexes Minimus (VAN BORTEL *et al.*, 1999) en Asie du Sud-Est, Punctulatus en Australasie (FOLEY *et al.*, 1993), le groupe Oswaldoi en Amérique du

Sud. Toutefois, pour des raisons de contraintes méthodologiques similaires à celles concernant les techniques cytogénétiques, les méthodes iso-enzymatiques sont maintenant délaissées au profit des méthodes basées sur l'amplification de l'ADN.

La biologie moléculaire

À partir des années 1990, le développement des techniques d'amplification de l'ADN par réaction en chaîne de la polymérase (PCR), ainsi que l'analyse du polymorphisme de l'ADN par le séquençage de fragments de petite taille, a pris le pas sur les autres méthodes d'identification. Le point commun de ces méthodes d'identification moléculaire reste l'étape d'amplification par PCR qui permet l'amplification de fragments d'ADN localisés dans des régions, soit prises au hasard dans le génome pour les tests de type RAPD-PCR (*Random Amplified Polymorphism DNA*) ou AFLP-PCR (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), soit connues pour tous les autres tests. Le but n'est pas ici de faire une présentation exhaustive de tous les tests moléculaires d'identification développés à ce jour pour les arthropodes d'intérêt médical ou vétérinaire, mais plutôt de donner des indications sur ceux qui sont les plus employés, avec leurs avantages et leurs limites.

Tests de type RAPD et RFLP-PCR

Des tests d'identification moléculaire à partir d'amorces de type RAPD, fragments arbitraires d'une dizaine de nucléotides supposés aléatoirement distribués dans le génome, ont été développés avec plus ou moins de succès pour différencier des espèces, dont des espèces jumelles chez les anophèles. Le manque de reproductibilité de ce type de test en a limité le développement. Les tests de type RFLP-PCR (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) comprennent l'amplification d'un locus connu du génome suivie de sa digestion par une enzyme de restriction. L'identification des différentes espèces/populations est faite grâce au polymorphisme de la région d'ADN ciblée, révélée par l'endonucléase, résultant en différents profils de

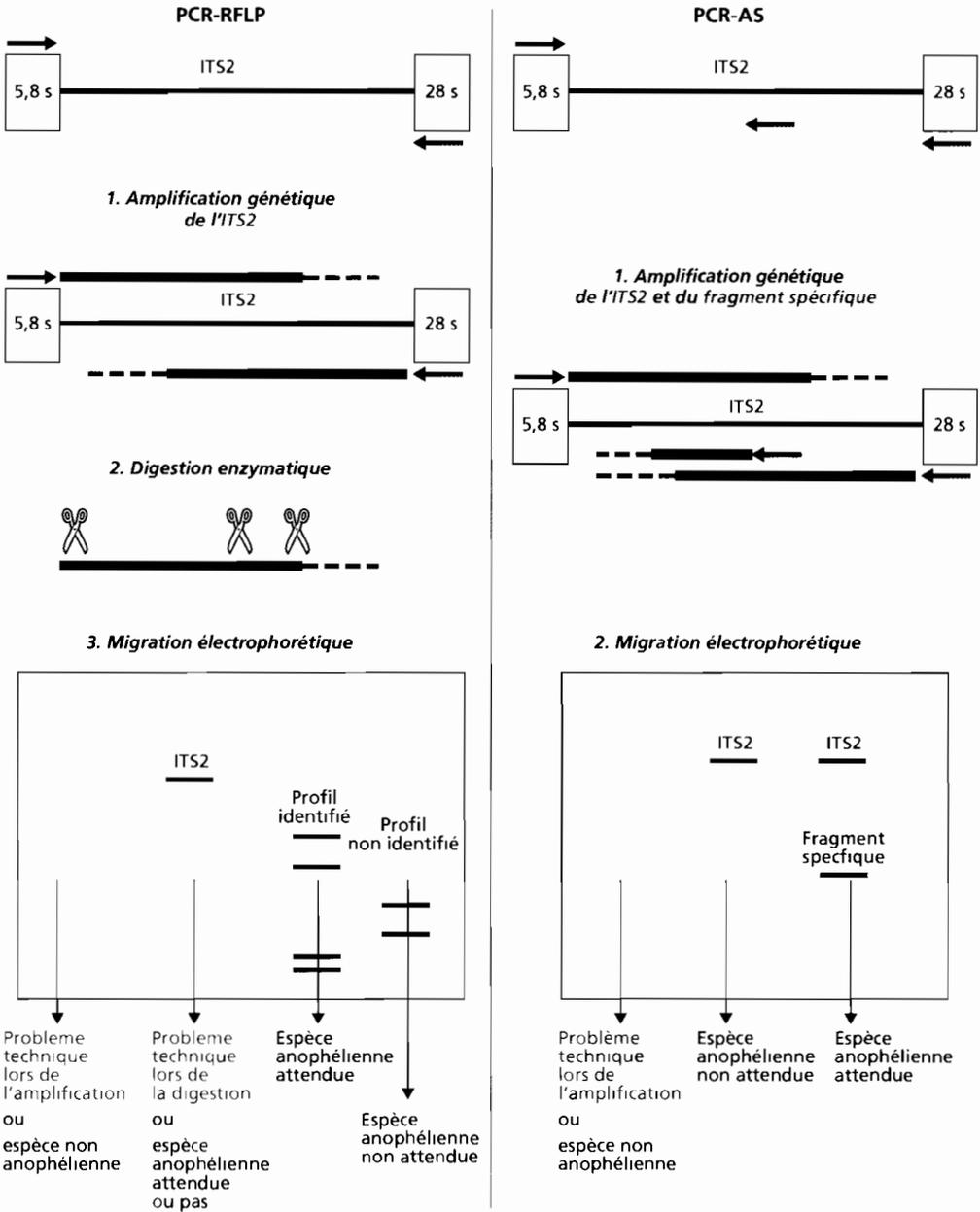


Figure 3.4 – Comparaison de deux méthodes d'identification moléculaire, RFLP et PCR.

digestion (fig. 3.4). La nécessité d'avoir deux étapes (amplification et digestion) rend cette technique longue et onéreuse. On peut citer les travaux sur les formes moléculaires M et S

d'*An. gambiae* (FAVIA *et al.*, 1997), sur le groupe *Funestus*, le complexe *Minimus*, le groupe *Punctulatus* et le complexe *Farauti* (BEEBE *et al.*, 2000). Ces tests sont aussi utilisés chez les

phlébotomes pour distinguer des espèces nord-américaines (MINTER *et al.*, 2013), les espèces d'intérêt pour la transmission de la leishmaniose en Méditerranée ou en Asie du Sud (TIWARY *et al.*, 2012).

Les tests de type SSCP-PCR et AFLP

Les tests de type SSCP-PCR (*Single Strand Conformation Polymorphism*) nécessitent une étape de dénaturation par la chaleur des produits PCR, qui sont ensuite refroidis très rapidement afin de générer la formation de structures secondaires d'ADN monobrin. Ces formations migrent de manière différentielle en fonction de leur taille et de leur conformation, liées au polymorphisme de la région ciblée. Cependant, l'étape d'électrophorèse est longue et peut poser des problèmes de reproductibilité. Des tests de ce type existent pour des espèces d'anophèles des groupes *Funestus* et *Minimus*.

L'identification par fragments AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) utilise le principe de la mise en évidence conjointe de polymorphisme de site de restriction et de polymorphisme d'hybridation d'une amorce de séquence arbitraire. La méthodologie et le développement de ce type d'outils, plus complexes que pour d'autres, a limité son utilisation. Il existe peu de tests moléculaires de ce type, mis à part pour les glossines (LALL *et al.*, 2010).

Les tests de type allèle-spécifique

La généralisation du séquençage partiel – notamment mitochondrial ou ribosomique – ou complet de nombreux génomes a permis le développement de tests d'identification moléculaire nécessitant une seule étape d'amplification. Le principe est de définir des couples d'amorces spécifiques de populations ou d'espèces définies à partir d'alignement de séquences. Ces tests de type allèle-spécifique (AS-PCR) sont plus faciles à mettre en œuvre et surtout beaucoup plus rapides. Ils permettent de tester rapidement un grand nombre de spécimens (fig. 3.5). L'association des différentes amorces peut varier : 1) deux couples d'amorces pour deux amplifications différentes ; 2) un

couple d'amorces externes universelles et des amorces spécifiques internes ; 3) une amorce universelle et plusieurs amorces espèces spécifiques ; ou 4) plusieurs amplifications avec des couples d'amorces espèces spécifiques. Lorsque les amorces de plusieurs espèces sont combinées dans une même réaction d'amplification, on parle alors de PCR multiplexe. Ce type de test a été développé chez de nombreux groupes d'arthropodes d'intérêt : le groupe *An. funestus* (GARROS *et al.*, 2004), le complexe *Culex pipiens* (DANABALAN *et al.*, 2012), le groupe *Culicoides obsoletus* et *C. pulicaris* (NOLAN *et al.*, 2007).

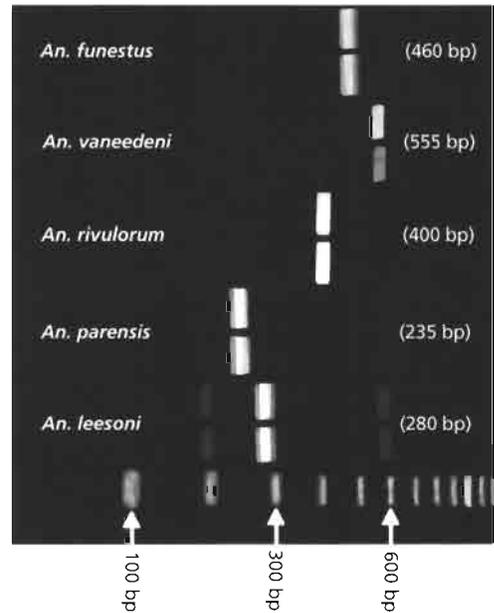


Figure 3.5 – Gel d'électrophorèse révélant les fragments de taille spécifique pour 5 espèces d'anophèles d'Afrique (test de type AS-PCR).

© Cirad/C. Garros

Le test LAMP

Plus récemment, un test de type LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*) a été développé pour le complexe *An. gambiae* (BONIZZONI *et al.*, 2009). Ce test utilise des amorces spécifiques mais ne requiert pas d'amplification conventionnelle par PCR, ce qui

en fait un test de choix pour des laboratoires à l'environnement technique limité.

La PCR quantitative

Les tests décrits ci-dessus présentent des limites lorsqu'un grand nombre d'échantillons ou d'individus doit être identifié. En effet, l'identification est réalisée pour chaque individu. Les tests d'identification quantitatifs utilisant des amplifications PCR en temps réel basés sur le polymorphisme de nucléotide unique (SNP) permettent un traitement haut-débit des échantillons et assurent l'identification et la quantification du nombre d'individus dans des lots mono- ou plurispécifiques. Ils nécessitent une seule étape d'amplification, et aucune étape post-PCR, réduisant considérablement le temps d'identification. Des tests quantitatifs ont été développés pour les anophèles (BASS *et al.*, 2008) et pour les moucheron du genre *Culicoides* (MATHIEU *et al.*, 2011).

Le barcode

La plupart des tests d'identification sont basés sur le polymorphisme des régions ribosomales telles que les ITS (*Internal Transcribed Spacer*), l'IGS (*Intergenic Spacer*) et le domaine D3 de l'ADNr 28S. Le polymorphisme des régions mitochondriales, et notamment de la région Folmer de la cytochrome oxydase I, COI, a été particulièrement utilisé pour des tests d'identification. Cette région est appelée région « barcode » car elle est utilisée pour les programmes de séquençage barcode qui utilisent la comparaison de séquences pour réaliser les identifications spécifiques (<http://www.barcodeoflife.org/>). L'intérêt de cette région est sa facilité d'amplification pour de très nombreux groupes, son fort polymorphisme inter-spécifique et son faible polymorphisme intra-spécifique (PRAMUAL *et al.*, 2014 ; CONTRERAS GUTIÉRREZ *et al.*, 2014 ; ZHANG et ZHANG, 2014). Des gènes nucléaires (*Ace2*) ou des régions microsatellites ont pu être aussi utilisés (DANABALAN *et al.*, 2012) chez les moustiques du genre *Culex*.

Critères de choix des méthodes de biologie moléculaire

L'expansion considérable de tests d'identification moléculaire est liée à leur sensibilité, à leur fiabilité et à leur rapidité à générer un nombre élevé d'identifications. Ces tests peuvent être appliqués à tous les stades de développement, indépendamment du sexe et même sur un spécimen endommagé. Cependant, ces tests d'identification restent des outils avec leurs limites. Pendant la phase de développement et de validation de l'outil, il est primordial de tester la sensibilité et la spécificité des amorces sur des individus couvrant la plus grande distribution géographique possible. Des essais inter-laboratoires de méthodes d'identification ont mis en évidence des différences notables dans les résultats d'identification pouvant conduire à des interprétations fausses sur la bioécologie ou la distribution des espèces (GARROS *et al.*, 2014). Le choix d'utilisation d'une méthode d'identification moléculaire doit être évalué en fonction de la connaissance taxonomique de la faune ciblée, de la possibilité d'existence de diversité cryptique, de la diversité ciblée (une espèce vs. plusieurs espèces) et du nombre d'échantillons à traiter. Les méthodes d'identification par barcode semblent prometteuses par le faible coût du séquençage ; elles demandent toutefois le développement de bases de données de la diversité des groupes et une identification morphologique préalable de qualité pour constituer la bibliothèque de référence.

IDENTIFICATION DES ARTHROPODES PAR APPROCHE PROTÉOMIQUE : MALDI-TOF MS

Pour se départir des contraintes et limites des outils actuellement présentés ci-dessus, de nouvelles méthodes sont basées sur l'analyse des empreintes protéiques obtenues par spectrométrie de masse (*i.e.*, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation – time-of-flight mass spectrometry*, MALDI-TOF MS). Ainsi, la comparaison de profils protéiques constitue une alternative pour la distinction d'organismes

sans avoir de connaissances sur leurs séquences. Les premiers travaux de comparaison et de classification de micro-organismes ont été réalisés par l'analyse de profils protéiques bactériens par MALDI-TOF MS (SANDRIN *et al.*, 2012). Les progrès réalisés ces quinze dernières années dans le développement des appareils de spectrométrie de masse et d'algorithmes pour l'analyse des données de spectrométrie de masse (FENSELAU et DEMIREV, 2001) ont permis à l'analyse de profils protéiques par MALDI-TOF MS de s'imposer comme une technique diagnostique de routine pour l'identification des micro-organismes dans les laboratoires de microbiologie.

Plus récemment, cette approche protéomique a été étendue à l'identification d'insectes. Depuis une étude pionnière évaluant le MALDI-TOF MS pour la distinction d'espèces de drosophiles, cette technique s'est avérée applicable pour l'identification des différents groupes d'arthropodes, comprenant les Drosophilidae (FELTENS *et al.*, 2010), Culicoides (STEINMANN *et al.*, 2013), Ixodidae (YSSOUF *et al.*, 2013), *Glossina* (HOPPENHEIT *et al.*, 2013), Phlebotominae (DVORAK *et al.*, 2014) et *Siphonaptera* (YSSOUF *et al.*, 2014). Le MALDI-TOF MS a également été utilisé avec succès pour l'identification de moustiques adultes permettant la discrimination d'espèces cryptiques telles que les formes moléculaires M et S d'*An. gambiae* (MULLER *et al.*, 2013). Et également pour l'identification d'espèces d'*Aedes* à partir des œufs et des larves, soulignant la robustesse de MALDI-TOF MS pour la détermination des espèces de moustiques très proches, avec un isolement génétique dû à des comportements pré-copulatoires (DIEME *et al.*, 2014 ; SCHAFFNER *et al.*, 2014).

Le principe du MALDI-TOF

Le principe général du MALDI-TOF MS est brièvement présenté sur la figure 3.6. L'objectif est de disposer à terme d'une base de référence pour les spectres protéiques permettant l'identification rapide de spécimens collectés sur le terrain ou directement sur leurs hôtes (*e.g.*, tiques, poux, puces). Afin de créer cette base de données, il faut disposer de plusieurs spécimens d'une même

espèce et de plusieurs espèces d'un même genre et/ou de plusieurs genres d'une même famille d'arthropodes. Ces échantillons serviront à évaluer la reproductibilité intra-espèce et la spécificité inter-espèces des spectres résultant des protéines extraites de la totalité ou d'une partie de l'arthropode d'intérêt (fig. 3.7). Cette extraction se fait par broyage de l'échantillon dans une solution acide. L'extrait protéique est alors déposé sur la cible du MALDI-TOF, puis recouvert d'une matrice favorisant son ionisation dans l'appareil de spectrométrie de masse afin d'obtenir une signature spectrale protéique de l'échantillon. Après avoir contrôlé les facteurs de reproductibilité et de spécificité, les spectres protéiques de ces échantillons servent à la création de la base de données. Cette dernière est alors évaluée à partir de spectres issus de nouveaux spécimens inclus ou non dans la base de données. Cette étape de validation « en aveugle » permet d'éprouver la technique et de définir des seuils de significativité d'identification correcte définie par des scores. La base de données ainsi créée est utilisable pour l'identification de spécimens d'intérêt, en comparant ces spectres protéiques avec ceux présents dans la base de données de référence. Le degré de similarité entre ces spectres permet d'y associer un nom d'espèce auquel est associé un score. Si ce score a atteint la valeur seuil de significativité défini lors de l'évaluation de la base de données, l'identification est considérée comme valide. Dans le cas contraire, il s'agit d'une espèce d'arthropode non incluse dans la base de données. Le spectre protéique de ce « nouveau » spécimen peut être ajouté à la base de données et servira de référence pour l'identification ultérieure des spécimens de la même espèce. En parallèle, une caractérisation morphologique et/ou moléculaire est indispensable pour déterminer l'identité de ce nouveau spécimen.

Les limites de l'identification par MALDI-TOF

Contrairement au génome, les profils protéiques d'un spécimen peuvent être modifiés en fonction de facteurs intrinsèques et extrinsèques.

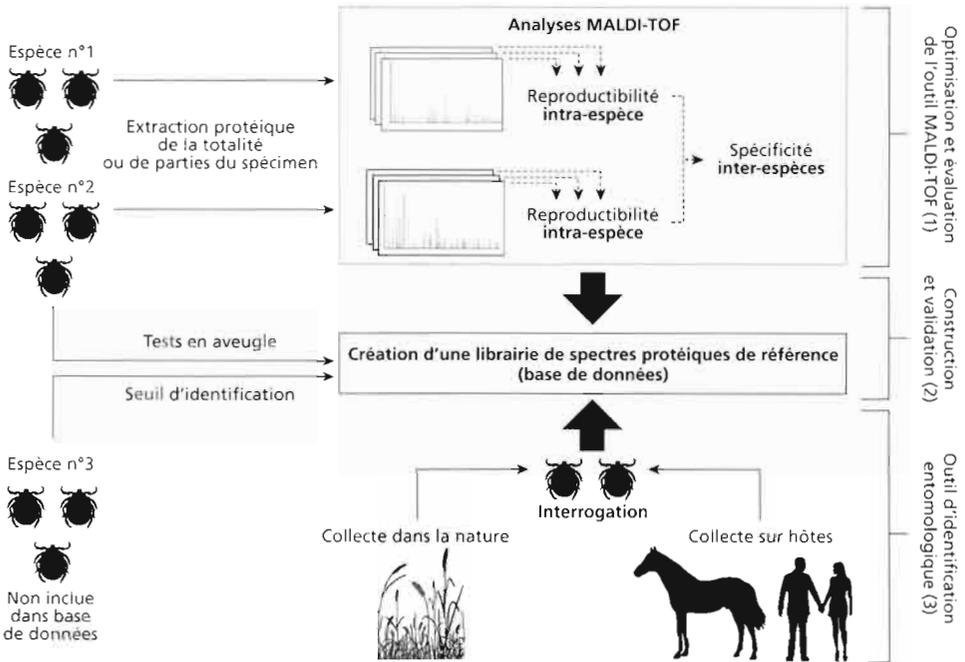


Figure 3.6 – Schéma synoptique de la création, évaluation et utilisation d'une base de données MALDI-TOF MS pour l'identification d'arthropodes. Les grandes étapes de cette approche sont regroupées et numérotées de (1) à (3).

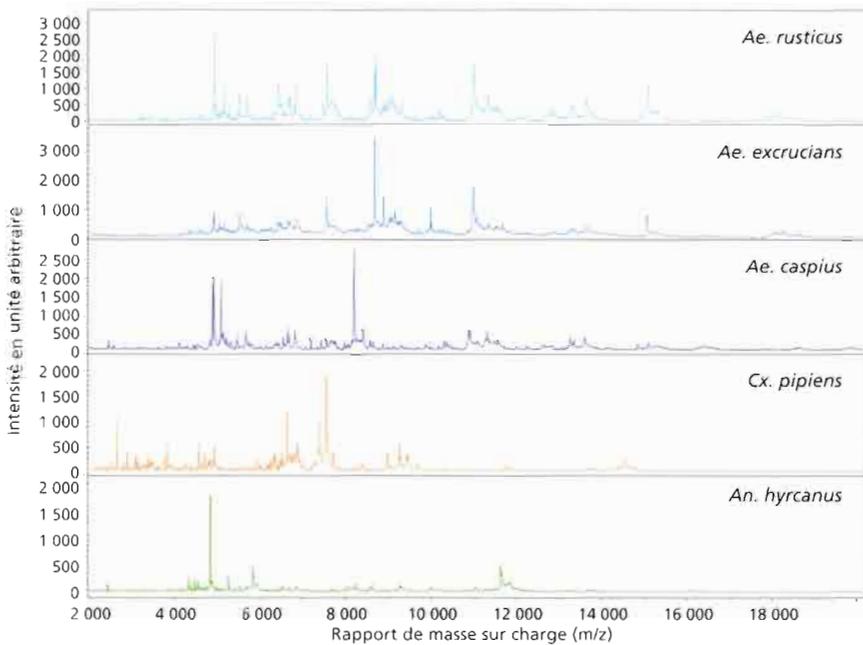


Figure 3.7 – Spectres protéiques de masse représentatifs de 5 espèces de Culicidae dont trois *Aedes*, un *Culex* et un *Anopheles*. (axe des abscisses : rapport de masse sur charge ; axe des ordonnées : intensité en unité arbitraire).

Concernant les facteurs intrinsèques, il s'agit principalement de modifications d'expression de répertoires protéiques se produisant lors de la métamorphose de l'arthropode (*e.g.*, insectes holométaboles). Afin de prendre en compte ces changements, des bibliothèques de spectres doivent être réalisées à chacun des stades de développement pour chacune des espèces que l'on souhaite étudier. Concernant les facteurs extrinsèques, pour les arthropodes hématophages, leur comportement trophique multi-hôtes peut engendrer une altération des spectres par rapport à leurs homologues non gorgés, ce qui altère leur identification. Pour éviter cela, l'abdomen n'est généralement pas utilisé pour l'identification des spécimens. Par ailleurs, le statut infectieux de l'arthropode modifie également les spectres protéiques. Ce changement n'altère pas l'identification du spécimen, mais permet au contraire de définir en plus son pathogène. Cette identification duale (*i.e.*, arthropode + pathogène) présente un intérêt majeur dans le cadre de programmes de surveillance des vecteurs, mais également pour le diagnostic entomologique de spécimens collectés sur leurs hôtes (FOTSO FOTSO *et al.*, 2014 ; YSSOUF *et al.*, 2015). Enfin, le mode de conservation des échantillons tel qu'en alcool aboutirait à une diminution de l'intensité et diversité des profils protéiques de spectrométrie de masse par rapport à des échantillons frais ou conservés à -20 °C.

Malgré ces contraintes, le MALDI-TOF MS est une méthode compétitive en termes de coût, de temps d'expérimentation et d'analyse, et de précision pour l'identification d'arthropodes au niveau du complexe d'espèces et même de l'espèce.

Cette technologie rapide, simple, fiable et économique du point de vue des consommables ne requiert aucune compétence entomologique. À l'instar du diagnostic clinique des micro-organismes, le typage par la méthode MALDI-TOF pourrait s'imposer comme la méthode de référence en entomologie médicale pour l'identification rapide d'arthropodes.

IDENTIFICATION PAR PATRON D'INTERFÉRENCE DE COULEURS

Au cours des années 2010, plusieurs équipes de recherche ont développé des outils d'identification permettant l'identification d'espèces d'insectes adultes sur la base des couleurs ou de patrons d'interférence optique, des ailes en particulier. Le principe est basé sur l'effet d'optique dû à la réflexion de la lumière blanche sur les ailes d'insectes. Ces ailes sont constituées de deux fines couches de chitine, entourant un espace interne avec de l'air, qui reflète environ 20 % de la lumière, provoquant ainsi une interférence. Tout comme le barcoding moléculaire ou le typage MALDI-TOF MS, l'approche consiste à affecter un nom d'espèce à un spécimen en comparant son patron d'interférence optique à une base de patrons de référence. Cette méthode peut également permettre de détecter un polymorphisme intra-spécifique ou de la diversité cryptique.

Ainsi, SHEVTSOVA *et al.* (2011) ont montré que les patrons d'interférence des ailes (*wing interference patterns*, WIP) d'insectes étaient constants chez une espèce quel que soit l'angle d'observation, en particulier grâce aux nervures de l'aile, qui assurent la rigidité, et aux taches pigmentées (fig. 3.8). Ils ont montré que ces motifs ne dépendaient que de l'épaisseur de l'aile, donc de la distance entre les deux couches de chitine, et de sa morphologie. Il est également possible chez certaines espèces d'observer des différences fixées entre les sexes. Il est très probable que ces patrons de couleurs soient un mode de communication intra- (en particulier entre sexes opposés) ou inter-espèces.

Des travaux en cours en 2015 montrent de plus que ce patron reste constant selon l'aile (droite ou gauche), selon l'état physiologique du vecteur (gorgé de sang ou non ; femelle gravide ou non), selon la provenance dans l'aire biogéographique de l'espèce (D. Sereno, comm. pers.).

Par ailleurs, NGUYEN *et al.* (2014) ont proposé une méthode d'analyse d'images 3D en couleurs naturelles pour des insectes de taille comprise

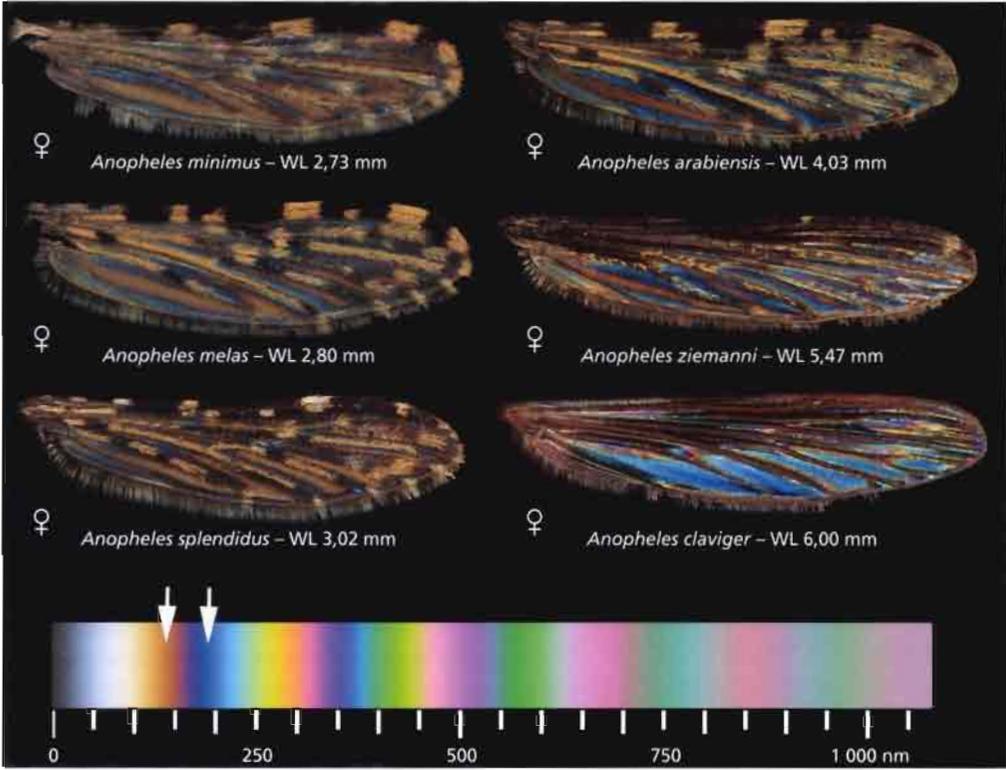


Figure 3.8 – Patrons d'interférence de couleurs spécifiques d'ailes d'anophèles (série de Newton). Les flèches représentent l'épaisseur de la membrane des ailes en nm (non publié, avec l'autorisation de Jostein Kjærandsen, université de Lund, Suède).

entre 3 et 30 mm de longueur, ce qui correspond à la taille de la plupart des vecteurs. Les photos des spécimens entiers sont prises à partir d'un simple appareil photo, sous différents angles, puis ces images 2D sont transformées en images 3D à l'aide d'un logiciel de reconstruction d'image. Ce système peut être utilisé sur le terrain. Cette méthode ne tire cependant pas pleinement profit des patrons de couleurs, et pour le moment elle ne permet pas l'identification automatisée des spécimens.

Les avancées importantes en informatique et en logiciels experts laissent penser que très rapidement des méthodes automatisées sensibles et spécifiques basées sur les couleurs et les formes seront disponibles pour identifier les spécimens au niveau spécifique. Les images produites

seront comparées avec des images standard de référence « stockées » dans des bases de données, qui devront être le plus exhaustives possible, de la même manière que les séquences génétiques sont référencées dans des bases de données telles que Genbank.

CONCLUSION

La recette idéale ou universelle pour l'identification de spécimens n'existe pas. Il n'y a pas de raison objective pour opposer les méthodes d'identification les unes aux autres. La méthode ou, plutôt, les méthodes à utiliser doivent tenir compte du contexte : objectif de l'étude, méthodes d'échantillonnage, compétences et connaissances sur la faune ciblée, conditions de conservation des spécimens, temps et moyens

disponibles, coût, utilisations envisagées des spécimens après l'identification ; autant de considérations à prendre en compte dans le concept de taxonomie intégrative.

De nouvelles méthodes prometteuses, complémentaires à la morphologie, sont en cours de développement (marqueurs génétiques, MALDI-TOF MS, interférence de couleurs) et il ne fait aucun doute que ces méthodes seront de plus en plus utilisées par les entomologistes médicaux et vétérinaires.

RÉFÉRENCES

- Abonnenc, E., 1972. *Les phlébotomes de la région éthiopienne* (Diptera, Psychodidae). Orstom, coll. mémoires Orstom, 55, Paris, 289 p.
- Bass, C., Williamson, M.S., Field, L.M., 2008. Development of a multiplex real-time PCR assay for identification of members of the *Anopheles gambiae* species complex. *Acta Trop.*, 107 (1) : 50-53.
- Beebe, N.W., Cooper, R.D., Foley, D.H., Ellis, J.T., 2000. Populations of the south-west Pacific malaria vector *Anopheles farauti* s.s. revealed by ribosomal DNA transcribed spacer polymorphisms. *Heredity*, 84 (Pt 2) : 244-253.
- Bonizzoni, M., Afrane, Y., Yan, G., 2009. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid identification of *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 81 (6) : 1030-1034.
- Boussès, P., Dehecq, J.S., 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.
- Coluzzi, M., Sabatini, A., della Torre, A., Di Deco, M.A., Petrarca, V., 2002. A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex. *Science*, 298 (5597) : 1415-1418.
- Contreras Gutiérrez, M.A., Vivero, R.J., Vélez, I.D., Porter, C.H., Uribe, S., 2014. DNA barcoding for the identification of sand fly species (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Colombia. *PLoS One*, 9 (1) : e85496.
- Danabalan, R., Ponsonby, D.J., Linton, Y.M., 2012. A critical assessment of available molecular identification tools for determining the status of *Culex pipiens* s.l. in the United Kingdom. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.*, 28 (4 Suppl) : 68-74.
- Dieme, C., Yssouf, A., Vega-Rua, A., Berenger, J.M., Failloux, A.B., Raoult, D., Parola, P., Almeras, L., 2014. Accurate identification of Culicidae at aquatic developmental stages by MALDI-TOF MS profiling. *Parasit. Vectors*, 7 : 544.
- Dvorak, V., Halada, P., Hlavackova, K., Dokianakis, E., Antoniou, M., Volf, P., 2014. Identification of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Parasit. Vectors*, 7 : 21.
- Favia, G., della Torre, A., Bagayoko, M., Lanfrancotti, A., Sagnon, N., Touré, Y.T., Coluzzi, M., 1997. Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation. *Insect Mol. Biol.*, 6 (4) : 377-83.
- Fenselau, C., Demirev, P.A., 2001. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.*, 20 (4) : 157-171.
- Feltens, R., Gerner, R., Kalkhof, S., Groger-Arndt, H., von Bergen, M., 2010. Discrimination of different species from the genus *Drosophila* by intact protein profiling using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *BMC Evol. Biol.*, 10 : 95.
- Foley, D.H., Bryan, J.H., 1993. Electrophoretic keys to identify members of the *Anopheles punctulatus* complex of vector mosquitoes in Papua New Guinea. *Med. Vet. Entomol.*, 7 (1) : 49-53.
- Fotso Fotso, A., Mediannikov, O., Diatta, G., Almeras, L., Flaudrops, C., Parola, P., Drancourt, M., 2014. MALDI-TOF mass spectrometry detection of pathogens in vectors: the *Borrelia crocidurae/Ornithodoros sonrai* paradigm. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 8 (7) : e2984.
- Frizzi, G., 1953. Cytogenetic study of *Anopheles maculipennis* in Italy ; extension of research to other species of Anopheles. *Bull. World Health Organ.*, 9 (3) : 335-344.
- Garros, C., Balenghien, T., Carpenter, S., Delécolle, J.C., Meiswinkel, R., Pédarrieu, A., Rakotoarivony, I., Gardès, L., Golding, N., Barber, J., Miranda, M., Borràs, D.B., Goffredo, M., Monaco, F., Pagès, N., Sghaier, S., Hammami, S., Calvo, J.H., Lucientes, J., Geysen, D., De Deken, G., Sarto, I., Monteys, V., Schwenkenbecher, J., Kampen, H., Hoffmann, B., Lehmann, K., Werner, D., Baldet, T., Lancelot, R., Cêtre-Sossah, C., 2014. Towards the PCR-based identification of Palaearctic *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae): results from an international ring trial targeting four species of the subgenus *Avaritia*. *Parasit. Vectors*, 14 (7) : 223.

- Garros, C., Koekemoer, L.L., Coetzee, M., Coosemans, M., Mangun, S., 2004. A single multiplex assay to identify major malaria vectors within the African *Anopheles funestus* and the Oriental *An. minimus* groups. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 70 (6) : 583-90.
- Harbach, R.E., Knight, K.L., 1980. *Taxonomists' Glossary of Mosquito Anatomy*. Plexus Publishing, Inc. Marlton, New Jersey. xi + 415 p.
- Hopkins, G.H.E., Rothschild, M., 1953 -1971. *An illustrated catalogue of the Rothschild collection of fleas (Siphonaptera) in the British Museum (Natural History)*. Vol I - V. British Museum Natural History, London.
- Hoppenhei, A., Murugaiyan, J., Bauer, B., Steuber, S., Clausen, P.H., Roesler, U., 2013. Identification of Tsetse (*Glossina* spp.) using matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 7 (7) : e2305.
- Lall, G K., Darby, A.C., Nystedt, B., Macleod, E.T., Bishop, R.P., Welburn, S.C., 2010. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of closely related wild and captive tsetse fly (*Glossina morsitans morsitans*) populations. *Parasit. Vectors*, 26 (3) : 47.
- Le Goff, G., Brengues, C., Robert, V., 2013. *Stegomyia* mosquitoes in Mayotte, taxonomic study and description of *Stegomyia pia* n. sp. *Parasite*, 20 : 31.
- Lent, H., Wygodzinsky, P., 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.*, 163 : 123-520.
- Mathieu, B., Delécolle, J.C., Garros, C., Balenghien, T., Setier-Rio, M.L., Candolfi, E., Cêtre-Sossah, C., 2011. Simultaneous quantification of the relative abundance of species complex members: application to *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus* (Diptera: Ceratopogonidae), potential vectors of bluetongue virus. *Vet. Parasitol.*, 182 (2-4) : 297-306.
- Minter, L.M., Yu, T., Florin, D.A., Nukmal, N., Brown, G.C., Zhou, X., 2013. Molecular identification of sand flies (Diptera: Psychodidae) in eastern North America by using PCR-RFLP. *J. Med. Entomol.*, 50 (4) : 920-924.
- Muller, P., Pfluger, V., Wittwer, M., Ziegler, D., Chandre, F., Simard, F., Lengeler, C., 2013. Identification of cryptic *Anopheles* mosquito species by molecular protein profiling. *PLoS One*, 8 (2) : e57486.
- Nguyen, C.V., Lovell, D.R., Adcock, M., La Salle, J., 2014. Capturing Natural-Colour 3D Models of Insects for Species Discovery and Diagnostics. *PLoS One* 9 (4) : e94346.
- Nolan, D.V., Carpenter, S., Barber, J., Mellor, P.S., Dallas, J.F., Mordue Luntz, A.J., Piertney, S.B., 2007. Rapid diagnostic PCR assays for members of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* species complexes, implicated vectors of bluetongue virus in Europe. *Vet. Microbiol.*, 124 (1-2) : 82-94.
- Post, R.J., Onyenwe, E., Somiar, S.A., Mafuyai, H.B., Crainey, J.L., Ubachukwu, P.O., 2011. A guide to the *Simulium damnosum* complex (Diptera: Simuliidae) in Nigeria, with a cytotoxic key for the identification of the sibling species. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 105 (4) : 277-297.
- Pramual, P., Adler, P.H., 2014. DNA barcoding of tropical black flies (Diptera: Simuliidae) of Thailand. *Mol. Ecol. Resour.*, 14 (2) : 262-271.
- Sandrin, T.R., Goldstein, J.E., Schumaker, S., 2013. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review. *Mass Spectrom. Rev.*, 32 (3) : 188-217.
- Schaffner, F., Kaufmann, C., Pfluger, V., Mathis, A., 2014. Rapid protein profiling facilitates surveillance of invasive mosquito species. *Parasit. Vectors*, 7 : 142.
- Shevtsova, E., Hansson, C., Janzen, D.H., Kjærandsen, J., 2011. Stable structural color patterns displayed on transparent insect wings. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108 (2) : 668-673.
- Smt, F.G.A.M., 1973. Siphonaptera, in *Insects and other arthropods of medical importance*. Ed. Smith KGV. *The Trustees of British Museum* (London) : 325-371.
- Sonenshine, D.E., 1991. *Biology of Ticks*, Vol. 1. Oxford University Press, New York.
- Steinmann, I.C., Pfluger, V., Schaffner, F., Mathis, A., Kaufmann, C., 2013. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry for the identification of ceratopogonid and culicid larvae. *Parasitology*, 140 (3) : 318-327.
- Tiwary P., Kumar D., Rai M., Sundar S., 2012. PCR-RFLP based method for molecular differentiation of sand fly species *Phlebotomus argentipes*, *Phlebotomus papatasi*, and *Sergentomyia babu* found in India. *J. Med. Entomol.*, 49 (6) : 1515-1518.
- Van Bortel, W., Trung, H.D., Manh, N.D., Roelants, P., Verlé, P., Coosemans, M., 1999. Identification of two species within the *Anopheles minimus* complex in northern Vietnam and their behavioural divergences. *Trop. Med. Int. Health*, 4 (4) : 257-265.
- Yssouf, A., Almeras, L., Terras, J., Socolovschi, C., Raoult, D., Parola, P., 2015. Detection of *Rickettsia* spp in ticks by MALDI-TOF MS. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 9 (2) : e0003473.

- Yssouf, A., Socolovschi, C., Leulmi, H., Kernif, T., Bitam, I., Audoly, G., Almeras, L., Raoult, D., Parola, P., 2014. Identification of flea species using MALDI-TOF/MS. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 37 (3) : 153-157.
- Yssouf, A., Flaudrops, C., Drali, R., Kernif, T., Socolovschi, C., Berenger, J.M., Raoult, D., Parola, P., 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid identification of tick vectors. *J. Clin. Microbiol.*, 51 (2) : 522-528.
- Zhang, R.L., Zhang, B., 2014. Prospects of using DNA barcoding for species identification and evaluation of the accuracy of sequence databases for ticks (Acari: Ixodida). *Ticks Tick Borne Dis.*, 5 (3) : 352-358.

Fontenille Didier, Almeras L., Garros C. (2017)

Concepts et méthodes d'identification des espèces
d'arthropodes

In : Duvallet G. (ed.), Fontenille Didier (ed.), Robert
Vincent (ed.). *Entomologie médicale et vétérinaire*

Marseille (FRA) ; Versailles : IRD ; Quae, p. 61-78

ISBN 978-2-7592-2676-4