



Institut des Sciences
Vétérinaires- Blida

Université Saad
Dahlab-Blida 1-



Projet de fin d'études en vue de l'obtention du

Diplôme de Docteur Vétérinaire

**Oiseaux et virus West Nile: Etude éco-épidémiologique dans les
régions Tizi-Ouzou et Bouira**

Présenté par

ARAB KOUCEILA

LAOUTI Yassine Djalal Eddine

Devant le jury :

Président :	TAZERART. F.	M.A.B	ISV Blida1
Examineur :	BESBACI. M.	M.A.A	ISV Blida1
Promoteur :	MEDROUH. B.	M.A.B	ISV Blida1

Année : 2016/2017

RESUME

Le virus West Nile ou le virus de Nil occidental est un flavivirus largement répandu dans le monde, il fait partie de la famille des *Flaviviridae* et il appartient au séro groupe de l'encéphalite japonaise (un groupe de 12 virus). Maintenu dans la nature dans un cycle de transmission enzootique Oiseau-Moustique-Oiseau, comme vecteur les moustiques ornithophiles et les oiseaux jouent le rôle de l'amplificateur. L'homme et les chevaux sont des hôtes accidentels, chez ces derniers, le virus entraîne des infections asymptomatiques avec parfois un syndrome nerveux mortel.

Une enquête transversale à visée descriptive a été menée dans l'objectif de détecter d'éventuels anticorps anti VWN dans deux régions en Kabylie. Nous avons prélevé 31 oiseaux sauvages appartiennent à deux espèces (grive et moineau). Les sérums ont été ensuite analysés par la technique ELISA de type compétition en utilisant un kit commercial (ID-Vet screening kit). 3 échantillons sont révélés positifs au test, c'est-à-dire une prévalence globale de 9,67% (3/31) avec des taux de séropositivité de 13,33% pour la grive et de 6,25% pour le moineau.

Dans cette étude, le site de capture pouvait être un facteur de risque, Tizi-Ouzou semblait être plus touchée. Aucune association entre la variable espèce et la séroprévalence n'est constatée dans ce travail.

Mots clés : Virus West Nile, Kabylie, grive, moineau, sérologie.

ABSTRACT

West Nile Virus is a widely replicated flavivirus in the world, it belongs to the family of Flaviviridae and belongs to the serogroup of the Japanese encephalitis (a group of 12 viruses). Kept in the wild in a transmission cycle bird-mosquito-bird, as a vector ornithophilic mosquitoes and birds play the role of enhancer. Man and horses are accidental hosts, in these latter; the virus causes asymptomatic infections, sometimes with a fatal nervous syndrome.

A cross-sectional descriptive survey was conducted with the objective of detecting possible anti von anti VWN in two regions in Kabylia. We caught 31 birds belonging to two species (thrush and sparrow). The sera were then analyzed by ELISA technique competition-type using a commercial kit (ID Vet screening kit). 3 samples were tested positive, that is to say one overall prevalence of 6,67% (3/31) with seropositivity rates of 13,33% for the thrush and 6,25% for the sparrow.

In this study, the capture site could be a risk factor; Tizi-Ouzou seemed to be more affected. No association between the species variable and the seroprevalence is found in this work.

Keywords: Virus West Nile, Kabylia, thrush, sparrow, serology.

ملخص

فيروس غرب النيل هو الفيروس المصفر (Flavivirus) منتشر على نطاق واسع في العالم، ينتمي إلى عائلة الفيروسات المصفرة (Flaviviridae) و ينتمي إلى مصلية التهاب الدماغ الياباني (مجموعة من 12 فيروس). يتواجد في الطبيعة في حلقة متواطئة بالحيوانات طير – بعوضة – طير، و كناقل بعوض ornithophiles والطيور تلعب دور مكثف. الإنسان والخيول مضيفان عرضيان، و عند هذين الأخيرين، الفيروس يسبب عدوى عديمة الأعراض مع اضطراب عصبي مميت أحيانا.

تحقيق عرضي لهدف وصفي أجريت للكشف عن احتمال وجود أجسام مضادة ضد فيروس غرب النيل في منطقتين موجودتين في القبائل. جمعنا 31 من الطيور البرية تنتمي إلى نوعي (السمنة والعصفور الدوري). ثم جرى تحليل الأمصال عن طريق تقنية ELISA من نوع منافسة باستعمال مجموعة أدوات تجارية (ID-Vet screening kit). 3 عينات كانت ايجابية، بمعنى، معدل انتشار عام يقدر بـ 9,67% (31/3) مع معدلات ايجابية المصل تقدر بـ 13,33% لطائر السمنة و 6,25% للعصفور الدوري.

وفي هذه الدراسة، يمكن أن يكون موقع الصيد أحد عوامل الخطر، حيث أن تيزي وزو هي أكثر منطقة إصابة. لا يوجد علاقة بين تغير النوع وعامل الانتشار المصلي، ولم يتم العثور عليها في هذا العمل.

كلمات البحث: فيروس غرب النيل، القبائل، السمنة، العصفور الدوري، الأمصال.

REMERCIEMENTS

Avant tout, nous remercions Dieu tout puissant de nous avoir aidés et de nous avoir donné la foi et la force pour achever ce modeste travail.

J'exprime ma profonde gratitude à mon promoteur Mr. Medrouh Bachir maître assistant à l'université de Blida 1, de nous avoir encadré avec sa cordialité franche et coutumière, nous le remercions pour sa patience et sa gentillesse, pour ses conseils et ces orientations clairvoyantes qui nous ont guidé dans la réalisation de ce travail. Chaleureux remerciement.

Je tiens à remercier :

Mr TAZERART. F. De nous avoir fait l'honneur de présider ce travail.

Mr BESBACI. M. D'avoir accepté d'évaluer et d'examiner notre projet.

Nous saisissons cette occasion pour exprimer votre profonde gratitude à l'ensemble des enseignants de l'institut des sciences vétérinaires de Blida.

Nous adressons nos sincères remerciements à tous ceux qui ont participé de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.

Dédicaces

*Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...
Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude,
L'amour, le respect, la reconnaissance...
Aussi, c'est tout simplement que*

Je dédie cette thèse ...

À MES CHERS PARENTS

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez.

Puisse les cieux, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

À MES CHERS FRÈRES ET SŒURS

Je leurs dédie ce travail en témoignage de mon affection fraternelle, de mon respect et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que la joie et la gaité vous suivent tout au long de votre vie.

À MES PRÉCIEUX PETITS NEVEUX

Mouloud, Sarah, Théa, Elena, Silas, je vous souhaite tous le bonheur du monde, et que la réussite soit tout au long de votre vie a vos coté.

À MES AMIS DE TOUJOURS :

Yassine ! Binôme exemplaire, sérieux et ambitieux. À Farid ami indispensable. À Faredj et son acolyte Samir (achrik). À Nordine toujours présent. En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments

agréables que nous avons passés ensemble.

Veillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère.

Mr : ARAB KOUCEILA

Dédicaces

*Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...
Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude,
L'amour, le respect, la reconnaissance...
Aussi, c'est tout simplement que*

Je dédie cette thèse . . .

À MES CHERS FRÈRES ET SŒURS

Je leurs dédie ce travail en témoignage de mon affection fraternelle, de mon respect et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que la joie et la gaieté vous suivent tout au long de votre vie.

À MES Cousins

En témoignage de mon affection, de ma profonde reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, vous protège et vous garde.

À MES AMIS DE TOUJOURS :

*En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble.
Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère.*

Mr : Laouti Yassine.

Table des matières

RESUME	2
REMERCIEMENTS	5
TABLE DES MATIERES	8
LISTES DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	11
LISTE DES ABREVIATIONS.....	13
Introduction :.....	16
1. CHAPITRE I : Le virus West Nile	18
1.1. Historique :.....	18
1.2. Taxonomie :.....	19
1.3. Particule virale.....	20
1.4. Le génome viral	21
1.5. Le cycle viral	22
1.5.1. Entrée virale	22
1.5.2. Cycle cytoplasmique.....	23
1.5.2.1.Libération de l'ARN génomique et traduction de la polyprotéine :.....	23
1.5.2.2.Réplication :.....	24
1.5.2.3.L'assemblage des particules virales :.....	24
1.5.3. Figure récapitulative.....	25
1.6. Symptomatologie	25
1.6.1. Chez l'homme :.....	25
1.6.2. Chez les oiseaux:.....	28
1.6.3. Chez les équidés :	29
2. Chapitre 2 : Epidémiologie	32
2.1. Répartition mondiale.....	32
2.2. Lignages et souches : Phylogéographie.....	33
2.3. Cycle de transmission.....	36
2.4. La situation de la maladie en Algérie	40
2.4.1. Donnés historiques sur la maladie	40
2.4.1.1.Isolement de virus	40
2.4.2. Enquêtes sérologiques sur la fièvre du nil occidental	41

2.4.3. Système de surveillance :	42
3. Chapitre III : Etude expérimentale	44
3.1. Matériel et méthodes :	44
3.1.1. Protocole de l'enquête :	44
3.1.1.1. Problématique et objectif :	44
3.1.1.2. Localisation géographique de la zone d'étude:	45
3.1.1.3. Population d'étude :	47
3.1.1.3.1. Oiseaux sédentaire :	47
3.1.1.3.2. Oiseaux migrateurs :	48
3.1.1.4. Capture des oiseaux et Période d'étude :	49
3.1.1.4.1. Méthode de capture :	49
3.1.1.4.2. Choix du cite de piégeage :	49
3.1.1.4.3. Période de capture :	49
3.1.1.5. Définition de cas :	51
3.1.1.6. L'échantillonnage :	51
3.1.1.7. Traitement des prélèvements:	51
3.1.1.7.1. Méthode de prélèvement :	51
3.1.1.8. Analyses des échantillons :	51
3.1.1.8.1. La technique ELISA de type compétition:	52
3.1.1.8.1.1. Principe:	52
3.1.1.8.1.2. Description du kit :	53
3.1.1.8.1.3. Objectifs et domaines d'application :	53
3.1.1.8.1.4. Appareillage et matériel :	53
3.1.1.8.1.5. Réactifs et produits :	54
3.1.1.8.1.5.1. CONTENU DE LA TROUSSE COMMERCIALE :	54
3.1.1.8.1.5.2. CONDITIONS DE CONSERVATION :	54
3.1.1.8.1.5.3. PRECAUTION :	54
3.1.1.8.1.5.4. PREPARATION DE LA SOLUTION DE LAVAGE :	55
3.1.1.8.1.6. Préparation des échantillons :	55
3.1.1.8.1.7. Mode opératoire :	56
3.1.1.8.1.7.1. ETAPE DE REPARTITION :	56
3.1.1.8.1.7.2. INCUBATION :	57
3.1.1.8.1.7.3. LAVAGE :	57
3.1.1.8.1.7.4. ETAPE DE CONJUGUE :	57

3.1.1.8.1.7.5.ETAPE DU CHROMOGENE SUBSTRAT :.....	57
3.1.1.8.1.8.Expression des résultats :.....	58
3.1.1.8.18.1. CALCULS :.....	58
3.1.1.8.1.8.2.VALIDATION DU TEST :	58
3.1.1.8.1.8.3.EXPRESSION DES RESULTATS :.....	59
3.2. Résultats :.....	60
3.2.1. Bilan de capture :.....	60
3.3. Résultats sérologique :	60
3.3.1. Résultats d'ELISA par compétition :	60
3.3.1.1.Séroprévalence globale :.....	60
3.3.1.2.Séroprévalence en fonction de site de capture :	61
3.3.1.3.Séroprévalence en fonction de l'espèce :	62
3.4. Discussion :.....	63
3.4.1. Méthode d'échantillonnage :	63
3.4.2. Population d'étude :.....	63
3.4.3. Méthode de laboratoire (ELISA par compétition) :.....	64
3.4.4. Résultats de sérologie :	64
3.4.4.1.Séroprévalence globale :.....	64
3.4.4.2.Séropositivité en fonction du site de capture :.....	65
3.4.4.3.Séropositivité en fonction de l'espèce :.....	65

Conclusion
Recommandation et Perspectives
Références Bibliographiques

A. LISTE DES FIGURES

➤ Figure 1.1 : Distribution géographique du virus West Nile, Encéphalite de St, Louis, Encéphalite Japonaise, et du virus Kunjin avant 1999	21
➤ Figure 1.2 : Cryo-microscopie électronique de particules du virus West Nile	22
➤ Figure 1.3 : Représentation schématique de l'organisation du génome du VWN et de la traduction des protéines virales avec une indication de leur fonction	23 25
➤ Figure 1.4: Mécanisme de fusion de la membrane virale à la membrane cellulaire par endocytose	32 33
.....	34
➤ Figure 1.5 : Représentation schématique du cycle de multiplication virale du VWN	35
➤ Figure 2.1 : Distribution globale du virus West Nile dans le monde	36 40
➤ Figure 2.2 : les lignages majeurs du VWN	46
➤ Figure 2.3 : Arbre phylogénétique des virus West Nile basé sur le séquençage complet du génome virale et montrant les groupes 1a et 1b (lignage 1) et le lignage 2	47 48 50
➤ Figure 2.4 : Répartition géographique des virus West Nile de lignages 1 et 2	50 60
➤ Figure 2.5 Distribution géographique des différents lignages du VWN	61 62
➤ Figure 2.6 : Cycle de transmission du virus West Nile	
➤ Figure 3.1 : La région d'étude Raffour (Bouira)	46
➤ Figure 3.2 : La région d'étude Daïra de Ouaguenoun (Tizi-Ouzou)	
➤ Figure 3.3 : le moineau «Passer domesticus»	
➤ Figure 3.4 : la grive « Turdus philomelos » (Photo personnelle 2015)	

- **Figure 3.5 : Filet japonais placé pour le moineau (Photos personnelles 2015).....**
- **Figure 3.6 : Filet japonais pour la grive (Photo personnelle 2017).....**
- **Figure 3.7 : Bilan de capture selon la région.
.....**
- **Figure 3.8 : Séroprévalence globale par la technique ELISA.....**
- **Figure 3.9 : Résultats en fonction de site de capture.....**

B. LISTE DES TABLEAUX

- | | |
|--|----------------|
| ➤ Tableau 1.1 : Le séro groupe de l'encéphalite japonaise..... | 20
27
42 |
| ➤ Tableau 1.2 : Recensement des cas humains de fièvre West Nile en Europe en Tunisie..... | 42
60 |
| ➤ Tableau 2.1 : Récapitulatif des enquêtes sérologique menées en Algérie..... | 61
62 |
| ➤ Tableau 2.2 : Enquête sérologique West Nile, 1975, Djanet..... | 62 |
| ➤ Tableau 3.1 : Distribution des oiseaux selon la région de capture..... | |
| ➤ Tableau 3.2 : Résultat global de la sérologie par la technique ELISA..... | |
| ➤ Tableau 3.3 : Séropositivité en fonction de site de capture..... | |
| ➤ Tableau 3.4 : Tableau de contingence donnant la relation séropositivité-espèce..... | |

Liste des abbreviations

- °C: **degrés Celsius.**
- AC: **anticorps.**
- AG: **antigène.**
- AMCR: **American Crow.**
- ARN: **Acide Ribo Nucléique.**
- BAGV: **Bagaza Virus (Virus Bagaza).**
- BF: **bruit de fond.**
- CV: **coefficient de variation.**
- CX: *Culex.*
- DENV: **Dengue Virus (Virus de la Dengue).**
- DO: **densité optique.**
- DOCN: **Densité optique de control négatifs.**
- DOCP: **Densité optique de control positifs**
- ELISA : **Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay.**
- FWN: **Fever West Nile.**
- IF: **ImmunoFluorescence.**
- IgG: **Immunoglobuline G.**
- IgM: **Immunoglobuline M.**
- JEV: **Japanese Encephalitis Virus (Virus de l'Encéphalite Japonaise).**
- M: **membrane.**
- Min: **minute.**

- ml: **millilitre.**
- MVEV: **Murray Valley Encephalitis Virus (Virus de l'Encéphalite de la Vallée de Murray).**
- NC: **non codant.**
- NS: **protéines non structurales.**
- NY99: **souche New York 1999 du virus West Nile.**
- OIE: **Office International des Epizooties.**
- PFE: **Projet de Fin d'Etude.**
- PFU: **Plaque Forming Unit (Unité Formant Plage).**
- Ph: **potentiel Hydrogène.**
- RE: **Réticulum Endoplasmique.**
- SLEV: **Saint-Louis Encephalitis Virus (Virus de l'Encepéhalite de Saint-Louis).**
- ST: **Sérum témoin**
- USUV: **Usutu Virus (Virus Usutu).**
- VON: **Virus Occidental du Nil.**
- VWN: **Virus West Nile.**
- WN: **West Nile.**
- WNV: **West Nile Virus.**
- YFV: **Yellow Fever Virus (Virus de la Fièvre Jaune).**

INTRODUCTION

Introduction :

L'observation de larve de Filaire de Bancroft chez un moustique par Manson permet pour la première fois en 1877 d'impliquer les insectes dans la transmission des maladies. En un quart de siècle, les grands cycles vectoriels étaient établis grâce aux travaux de nombreux scientifiques, notamment Bancroft en 1899 sur la Filaire, et Finlay en 1881 sur la fièvre jaune [Rodhain et Perez 1985].

Néanmoins, depuis une vingtaine d'années on assiste à une dramatique résurgence des maladies vectorielles avec émergence de nouvelles maladies ou la recrudescence et la globalisation de maladies précédemment sous contrôle [Gulber 2002]. Le changement climatique est souvent incriminé dans cette résurgence. Néanmoins, l'interaction entre les systèmes vectoriels et leurs environnement est complexe, mais sans doutes les changements démographiques et sociaux actuels qui sont responsables de la résurgence des maladies infectieuses, en général et vectorielles en particulier [Gulber 2002, Rodhain 2003]. La fièvre du Nil occidental ou fièvre West Nile est un exemple d'arbovirose émergente.

Le virus West Nile est un arbovirus, isolé la première fois en Ouganda en 1937 dans le sang d'une femme fébrile. Il appartient à la famille des Flaviviridae, genre Flavivirus. Son cycle naturel fait intervenir les oiseaux qui constituent le réservoir et les moustiques ornithophiles essentiellement de genre *Culex* en tant que vecteur. [Medrouh B., 2015]. Initialement, la fièvre WN était considérée comme une arbovirose mineure, essentiellement responsable chez l'homme d'infections asymptomatiques ou d'un syndrome pseudo-grippal et plus rarement d'encéphalites pouvant être mortelles. La situation a changé dans les années 1990 avec des épidémies incluant de nombreux cas humains, comme en Algérie (1994), en Roumanie (1996), en Tunisie (1997), en Israël (2000), et des cas équin au Maroc (1996), Italie (1998), Israël et France (2000) [Zeller et Schuffenecker, 2004].

En Algérie, le virus a été isolé pour la première fois en 1968 à l'institut pasteur d'Alger. Cependant ce n'est qu'en 1994 que les premiers résultats officiels sont enregistrés, lors d'une enquête dans le cadre du projet GCP/RAB/002 [Medrouh B., 2015]. Ce qui pose beaucoup de difficultés à l'étude et à la compréhension de cette maladie dans notre pays.

CHAPITRE 1 :

Le virus West Nile

1. CHAPITRE I : Le virus West Nile

Historique :

Après ,60 an après son isolement initial dans le sang d'une femme fébrile dans la province du Nil occidental d'Ouganda en 1937 **[Smithburn et al., 1940]**, le VON reste une cause occasionnelle de maladie fébrile en Afrique, au Moyen-Orient, dans certaines parties de l'Europe et de l'ex-Union soviétique, au Sud d'Asie et en Australie. Elle est sortie de l'obscurité dans les années 90 ou des éclosions de gravité inhabituelle en Algérie (1994 et 1997), en Roumanie (1996), Tunisie (1997), Russie (1999), États-Unis (1999), Israël (2000) et Soudan (2002) **[Mackenzie et al., 2004]**. Suite à sa reconnaissance dans la ville de New York en 1999 **[Nash et al., 2001]**, le virus s'est propagé rapidement dans le nouveau monde, atteignant l'Argentine en 2006 **[Morales et al., 2006]**.

En Algérie, une épidémie s'est produite entre août et septembre 1994 dans l'oasis de Timimoune au Sahara central. Environ 50 cas présentaient une forte fièvre et des signes neurologiques: parmi eux, 20 étaient des cas cliniques d'encéphalite dont 8 morts. La sérologie WN a été réalisée sur 18 cas (14 cas cliniques et 4 probables) et 17 d'entre eux ont été jugés positifs pour le virus. Quinze patients (dont deux morts) avaient des anticorps IgM avec ou sans IgG et deux avaient seulement IgG. Tous les 14 cas cliniques étaient IgM-positifs et 13 d'entre eux étaient des enfants âgés entre 10 mois et 9 ans **[LE GUENNO et al., 1996]**.

Le VON est un membre du sérocomplexe de l'encéphalite japonaise, qui contient trois autres Flavivirus médicalement importants: encéphalite Japonaise, encéphalite de St Louis et encéphalite de la vallée de Murray.

Avant l'apparition du VNO dans les Amériques, chacun de ces virus présentait des distributions géographiques relativement uniques (figure 1). Les analyses phylogénétiques de la séquence complète du génome ou de la séquence du gène de la protéine E divise les souches de VWN en deux lignées génétiques (I et II) **[Lanciotti et al., 1999, 2002]**. Les principales manifestations humaines du VON ont été seulement avec le lignage I WNVs. Les

lignages II WNVs sont maintenus en enzootique principalement en Afrique et ne sont pas associés à des maladies épidémiques. Le virus Kunjin en Australie, bien que classé à l'origine comme séparé dans le sérocomplexe de l'encéphalite japonaise, est maintenant reconnu comme un sous-type de lignée I WNV.

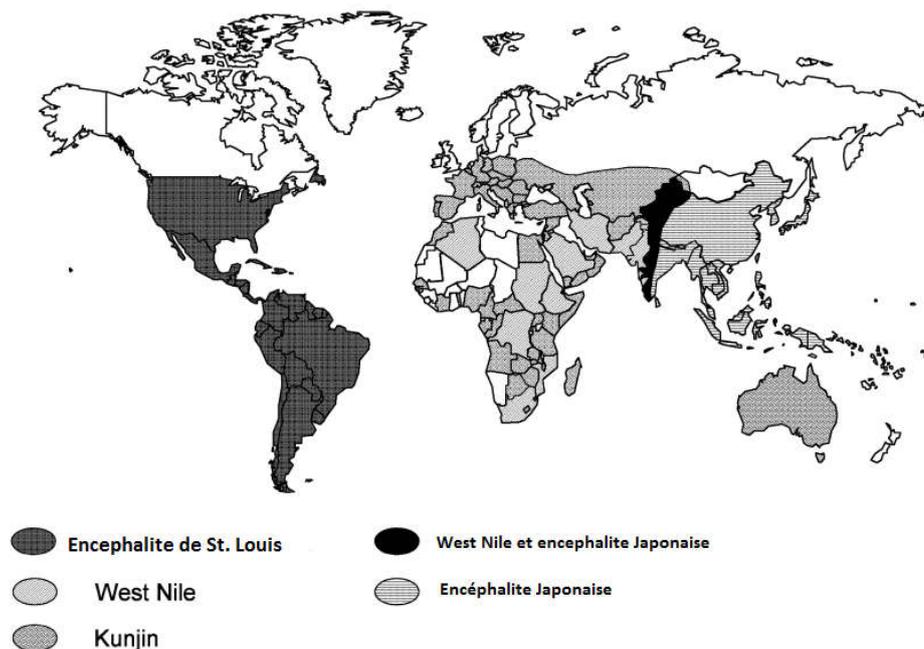


Figure 1.1 : Distribution géographique du virus West Nile, Encéphalite de St, Louis, Encéphalite Japonaise, et du virus Kunjin avant 1999.

Taxonomie :

Le VWN appartient à la famille des Flaviviridae, genre Flavivirus. Il fait partie d'un Complexe de virus comprenant le virus de la fièvre jaune (YFV), à l'origine du nom du genre (flavius signifie « blond » en latin), le virus de la Dengue (DENV), ainsi que de virus à l'origine d'encéphalites comme l'encéphalite japonaise (JEV) qui circule en Asie, le virus de l'encéphalite de Saint-Louis (SLEV) rencontré en Amérique, ou le virus de Murray Valley (MVEV) rencontré en Australie. JEV, SLEV, MVEV et VWN appartiennent au sérocomplexe de l'encéphalite japonaise.

Récemment, des virus proches ont été similaires en Europe : le virus Usutu (USUV),

rencontré jusque là en Afrique, a été isolé en Autriche, en Hongrie, en Allemagne, en Suisse, en Italie et en Espagne [Weissenböck et al., 2003 ; Bakonyi et al., 2007 ; Steinmetz et al., 2011 ; Becker et al., 2012; Savini et al., 2011 ; Busquets et al., 2008] ; un nouveau virus émergent, le virus Bagaza (BAGV), a été identifié en Espagne en 2010 (Tableau 1.1) [Agüero et al., 2011].

Les Flavivirus ont des propriétés antigéniques proches, en particulier ceux du complexe de l'encéphalite japonaise, ce qui cause des réactions sérologiques croisées fréquentes [Calisher, C.H et al., 1989].

Tableau 1.1 : Le séroroupe de l'encéphalite japonaise

Virus	Main areas of circulation	Human diseases	Animals infected	Reservoirs	Vector (WNV isolation)
Japanese Encephalitis Virus (JEV)	South East Asia, India, Japan, Korea, Philippines	fever, encephalitis, meningitis	pigs, horses	pigs, birds	mosquitoes
West Nile Virus (WNV)	worldwide	fever, encephalitis, meningoencephalitis	birds, mammals, reptiles	birds	mosquitoes (ticks)
Murray Valley Encephalitis Virus (MVEV)	Australia	fever, encephalitis, meningoencephalitis	sheep, birds	water fowl	mosquitoes
St. Louis Encephalitis Virus (SLEV)	USA, Central and South America	fever, encephalitis	none known	birds	mosquitoes
Usutu Virus (USUV)	Africa, Austria, Hungary, Southern Europe, Germany	fever, encephalitis in immunosuppressed individuals	birds	rodents, birds	mosquitoes
Rabensburg Virus (RABV)	Austria/Czech Republic	none known	none known	unknown	mosquitoes
Koutanga Virus (KOUV)	Senegal, Somalia, Central African Republic	none known	none known	(rodents)	mosquitoes, ticks
Alfy Virus (ALFV)	Australia	fever	none known	birds	mosquitoes
Yaounde Virus (YAOUV)	Cameroon, Senegal, Central African Republic, DR Congo	none known	none known	(rodents)	mosquitoes
Cacipacore Virus (CPCV)	Brazil	(fever)	(horses)	birds	unknown

Particule virale

Le VWN est un virus à ARN positif, simple brin et enveloppé de 45 à 50 nm de diamètre (figure 2). Le génome du VWN est petit (11000 à 12000 nucléotides) et comporte deux régions non codantes aux extrémités 3' et 5'. Il code pour 10 protéines dont 3 sont structurales (protéines C, M et E) et 7 sont non structurales « NS » [Brinton, 2002, Petersen et Roehrig, 2001]. L'enveloppe virale dérive de la membrane cellulaire de l'hôte et contient 2 glycoprotéines. Les protéines E associées aux protéines M permettent l'adhésion aux cellules, le tropisme tissulaire, la stimulation des cellules immunitaire et la réplication [Kimura et Ohyama, 1988].

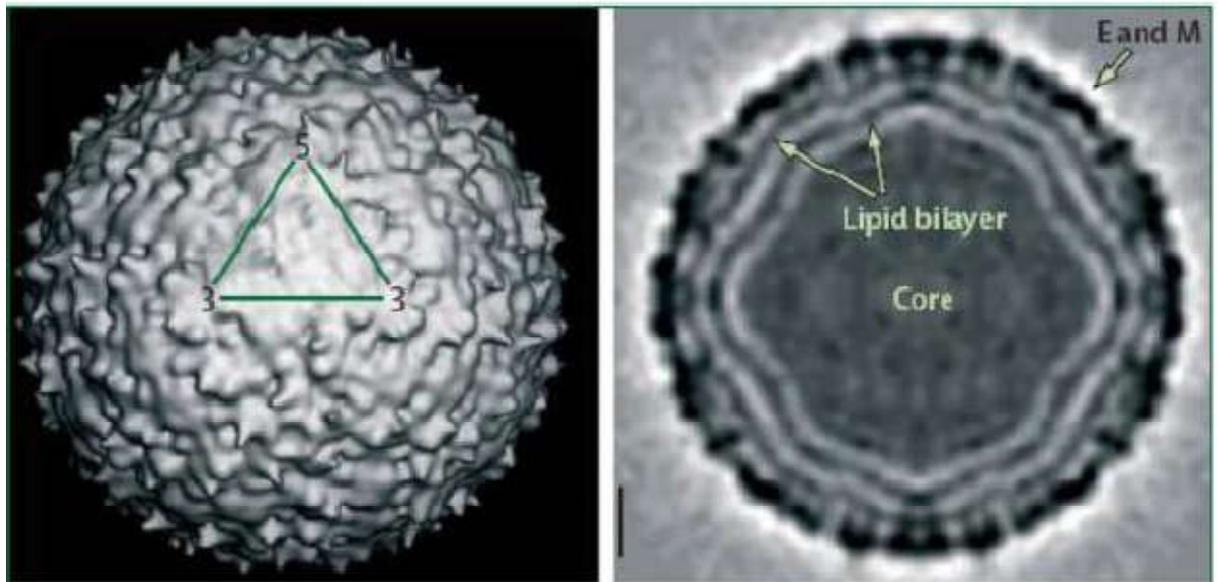


Figure 1.2 : Cryo-microscopie électronique de particules du virus West Nile (**d'après Kramer et al., 2007**).

Le génome viral

Le génome viral est constitué d'un ARN simple brin de 11 kb coiffé à son extrémité 5' (7-méthylguanosine), non polyadénylé en 3' (figure). Les régions non codantes (NC) en 5' et 3' sont conservées et forment des structures secondaires en épingle à cheveux, nécessaires pour la transcription, la traduction et l'empaquetage de l'ARN viral [Brault, 2009]. Le génome complet est traduit en une polyprotéine qui est clivée pendant et après la traduction par des protéases cellulaires et virales. La partie 5' de la polyprotéine code pour les protéines structurales (C, prM, E) et la partie 3' pour les protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5) (Figure 1.3). Les protéines structurales sont nécessaires pour l'encapsidation (par la protéine C) de l'ARN viral, et les protéines de surfaces (M et E) sont requises pour l'interaction et la fusion avec la cellule cible [Kimura et al., 1988]. M et E sont aussi à l'origine de la stimulation de la réponse lymphocytaire B et T [Campbell et al., 2002 ; Sanchez et al., 2005]. La protéine d'enveloppe est la plus immunogène et induit la majorité des anticorps neutralisants [Sanchez et al., 2005]. Elle est constituée de trois domaines structuraux, parmi lesquels le domaine III est le plus immunogène. Les protéines non structurales jouent un rôle dans la réplication virale,

l'assemblage des virions et l'évasion à la réponse antivirale de l'hôte [Kummerer et Rice, 2002; Liu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2003; Munoz-Jordan *et al.*, 2003; Pugachev *et al.*, 2004].

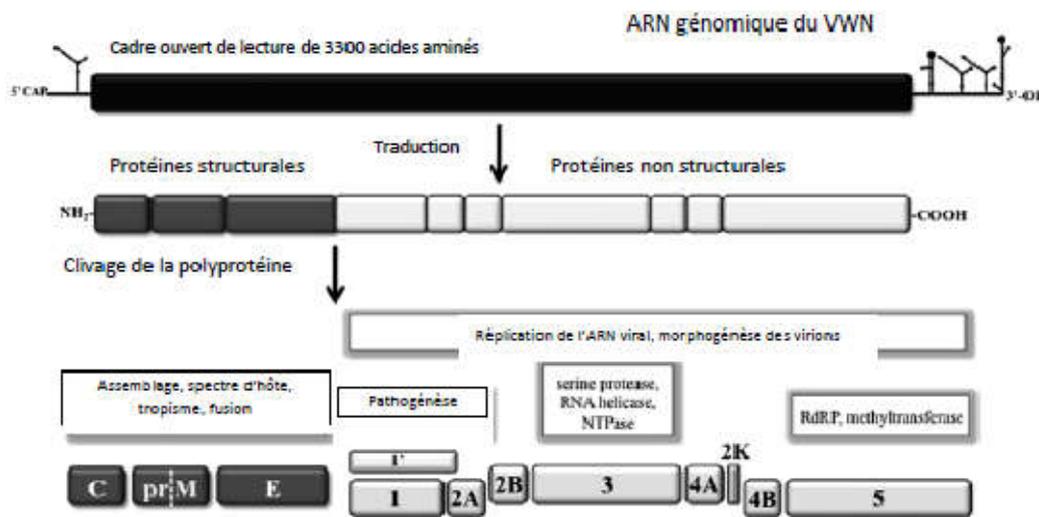


Figure 1. 3 : Représentation schématique de l'organisation du génome du VWN et de la traduction des protéines virales avec une indication de leur fonction (d'après Murray *et al.*, 2010).

Le cycle viral

Le virus WN est capable de se multiplier dans divers cultures cellulaires, à savoir les cellules aviaires, de mammifères, d'amphibien et d'insectes. Cependant, l'effet cytopathologique est observé dans quelques cultures mais pas dans d'autres, malgré l'efficacité de la réplication [Brinton, M. A., al ; 1986].

Le mécanisme comporte deux étapes l'une au contact de la cellule, l'autre à l'intérieur de cette dernière dans le cytoplasme.

1.1.1. Entrée virale

L'entrée virale suppose l'internalisation du virus par endocytose suite à l'interaction de l'enveloppe virale avec les récepteurs (qui ne sont pas tous identifiés). L'abaissement du pH dans l'endosome entraîne le processus de fusion entre l'enveloppe et la membrane endosomale libérant ainsi la capsid (Figure 1. 4).

En effet, l'exposition à un pH acide entraîne un changement de conformation majeur de la protéine E notamment sa trimérisation et un réarrangement de sa surface exposant le peptide

de fusion vers la membrane cible [Chu et Ng, 2004 ; Gollins et al., 1986a]. Ce peptide s'insère alors et se replie en épingle à cheveux permettant de rapprocher les deux membranes, ce qui entraîne la formation d'un pore permettant le passage de la capside.

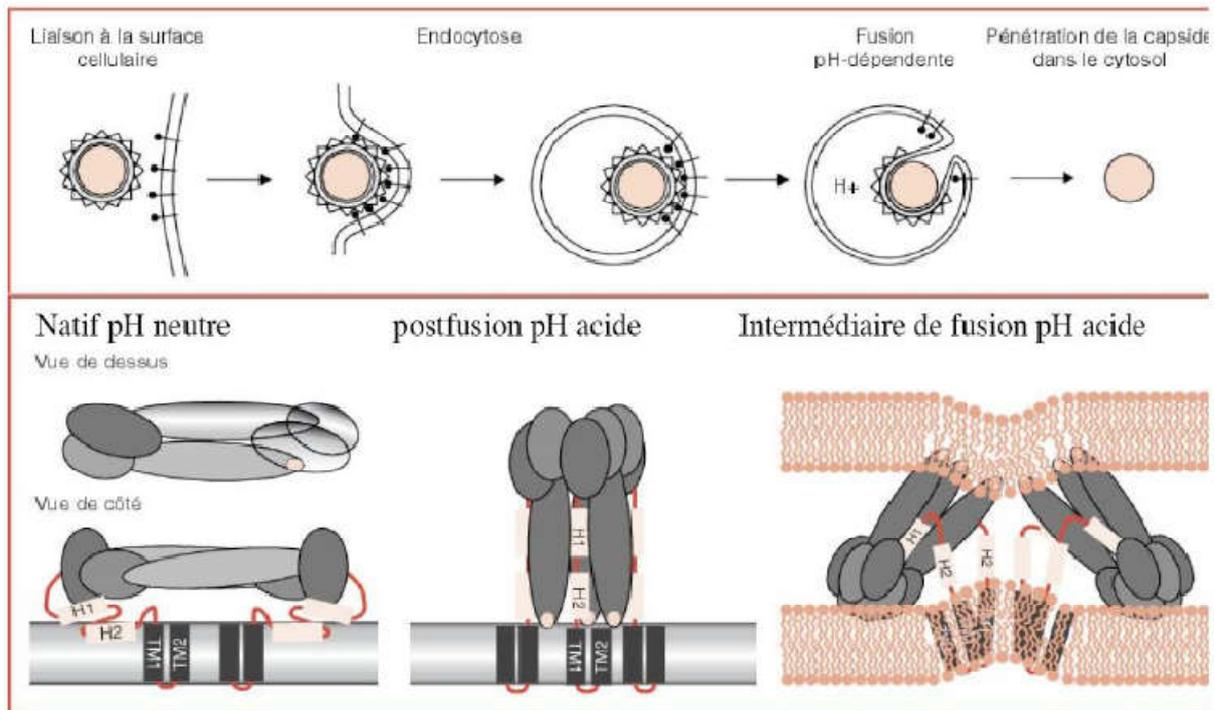


Figure 1.4: Mécanisme de fusion de la membrane virale à la membrane cellulaire par endocytose (d'après Cosset, 2010).

1.1.2. Cycle cytoplasmique

Il se déroule sur 3 volets :

1.1.2.1. Libération de l'ARN génomique et traduction de la polyprotéine :

L'ARN(+) est coiffé en 5' mais ne possède pas de queue polyA en 3'. Par contre, la région 3' NC possède une structure en épingle à cheveux hautement conservée. Les clivages protéiques sont co-traductionnels et se font grâce à des protéases virales et cellulaires. Les protéines d'enveloppe doivent être glycosylées. Pour cela, elles doivent transiter dans le RE et le Golgi, ce qui nécessite une séquence signal. En cours de synthèse, des séquences signal adressent les régions prM, E et NS1 de la polyprotéine dans le RE grâce à des régions

transmembranaires. Les séquences signal sont ensuite clivées par des signalases cellulaires. Les protéines prM et E restent ancrées dans la membrane alors que la protéine NS1 est libérée dans la lumière du réticulum et sera excrétée. La protéine prM sera clivée plus tardivement dans le trans-Golgi par des protéases de types furines résidentes du Golgi. Sur la face cytoplasmique, la protéine NS3 nécessite NS2B comme cofacteur pour réaliser les clivages protéiques.

1.1.2.2. Réplication :

La réplication débute par la synthèse d'un brin d'ARN de polarité négative qui sert ensuite de base pour la synthèse d'un ARN génomique positif sous un mode semi-conservatif et asymétrique. La réplication est couplée à la traduction et à l'assemblage. Le complexe de réplication s'assemble avec les protéines qui viennent d'être traduites. La réplication est également couplée à l'encapsidation.

1.1.2.3. L'assemblage des particules virales :

il se fait par association de l'ARN avec les protéines de capsid. L'acquisition de l'enveloppe se fait par bourgeonnement au niveau de RE. prM sert de chaperon pour maintenir la conformation de la protéine E afin d'éviter l'exposition du peptide de fusion. Une fois le bourgeonnement réalisé, il y a formation de particules virales immatures avec un aspect hérissé correspondant à l'insertion d'hétérodimères prM-E dans l'enveloppe virale.

Le clivage de prM en M se déroule dans l'appareil de Golgi permettant la maturation de la particule virale **[Mackenzie et Westaway, 2001]**.

1.1.3. Figure récapitulative

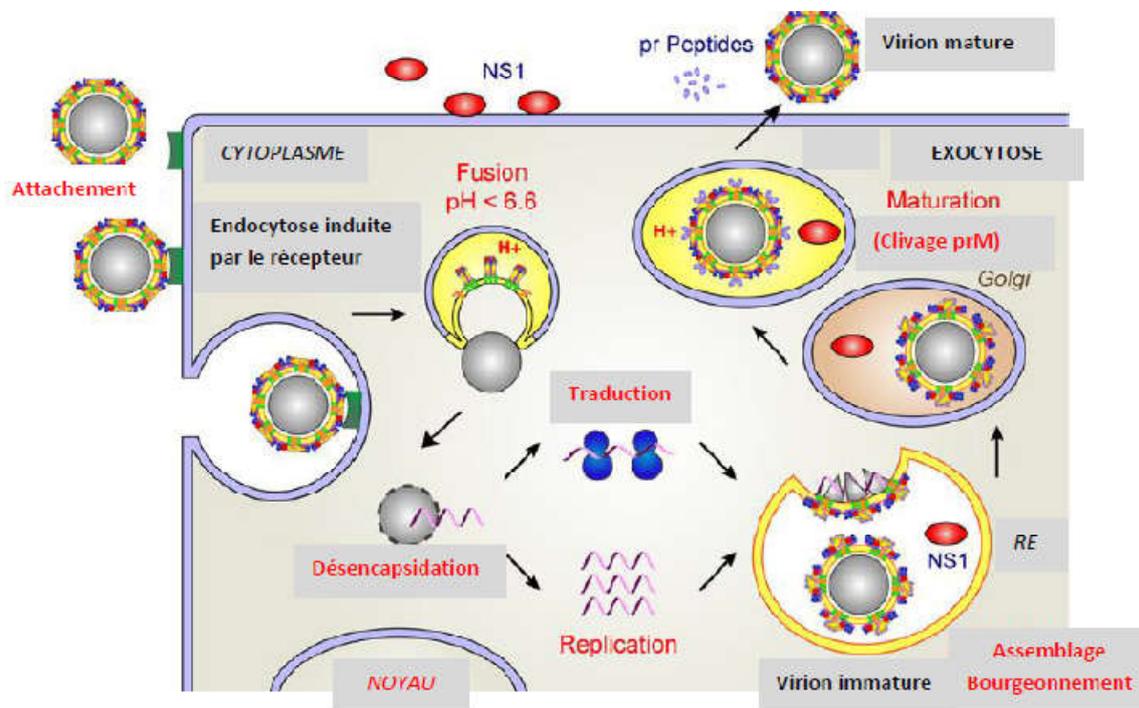


Figure 1.5 : Représentation schématique du cycle de multiplication virale du VWN (d'après Heinz et Stiasny, 2012).

Symptomatologie

1.1.4. Chez l'homme :

Chez l'homme, l'infection est le plus souvent asymptomatique (80%) et ne motive pas une consultation médicale. Les manifestations cliniques s'expriment sous la forme d'un syndrome grippal bénin, caractérisé par une fièvre d'apparition brutale, qui dure 3 à 5 jours, avec des maux de tête, une irritation de la gorge, une myalgie, des arthralgies, de la fatigue, une conjonctivite et une douleur rétrobulbaire [Kouzana, 2000]. Une éruption maculopapulaire ou roséolaire est visible dans environ 50% des cas, partant du tronc vers les extrémités et la tête. Une anorexie, des nausées, des douleurs abdominales, de la diarrhée, une orchite et des signes respiratoires et hépatiques ont aussi été décrits, généralement chez les jeunes patients. Souvent accompagnés de la lymphodénopathie [Watson, J.T., al;

2004]. Dans moins de 15% des cas cliniques, une méningite aseptique aiguë ou une encéphalite se développent, associées à de la raideur, des vomissements, une confusion mentale, des anomalies de vigilance, une somnolence, des tremblements des extrémités, des réflexes anormaux, des convulsions, parésies, voire un coma. Les atteintes neurologiques sont le résultat du neurotropisme du VWN qui s'exprime en général par une méningo-encéphalite [**Le Guenno et al ., 1996, Pruzanski et Altman ; 1962].**

Les manifestations cliniques dues à l'infection par le VWN ont été généralement, associées aux conditions épidémiologiques. En effet lors des premières épidémies en Israël et d'Égypte, l'aspect le plus fréquent a été un syndrome fébrile et algique avec parfois polyadénopathies et éruptions cutanées guérissant en quelques jours et sans séquelles. Ce syndrome pseudo-grippal atteint surtout les enfants et les adolescents dans les zones de forte endémicité [**Chastel et al., 1977, Hayes, 2001].**

L'évolution de la FWN humaine va d'une guérison spontanée totale jusqu'à des séquelles neurologiques parfois dramatiques, voir l'installation d'un coma neurologique dont l'issue est habituellement fatale. En cas de guérison l'homme développe une immunité spécifique et durable [**Pruzanski et Altman, 1962].**

En date d'août 2012, 1590 cas humains de la maladie à virus West Nile ont été signalés aux États-Unis d'Amérique. Parmi ceux-ci 56% ont été classés comme maladie neuro-invasive. Durant cette même année nombreux cas humains ont été observés à travers l'Europe, le Moyen-Orient ainsi qu'en Afrique du nord (Tableau 1.2).

Tableau 1.2 : Recensement des cas humains de fièvre West Nile en Europe en Tunisie (n=775) en 2012 (04/10/2012).Source : European Center for Disease Prevention and Control

Pays	Nombre de cas
Grèce	161
Hongrie	8
Italie	45
Croatie	5
République de Macédoine	4
Israël	46
Romania	14
Kosovo	4
Palestine (territoire occupé)	2
Russie	397
Serbie	64
Tunisie	22
Algeria	1

Il n'existe pas à l'heure actuelle de traitement efficace contre le FWN. Toutefois, les traitements symptomatiques peuvent être utilisés.

La vaccination contre le VWN serait la meilleure protection pour les personnes à risque, (âgées ou habitant des zones a risque). Le vaccin idéal pour une utilisation chez l'homme serait celui qui pourrait être utilisé dans une épidémie imminente et qui permettrait de fournir une immunisation rapide, de préférence quelques jours après une dose unique. Actuellement il n'existe aucun humain contre le VWN. Toutefois, il existe des essais cliniques sur des vaccins comme ChimeriVax-WN02 [Biedenbender et al., 2011] hautement immunogène. Ce vaccin est encore dans les phases d'essai.

1.1.5. Chez les oiseaux:

Chez les oiseaux la sensibilité à l'infection varie en fonction des espèces. Le corbeau américain et le geai bleu (*Cyanocitta cristata*) sont deux espèces sensibles chez qui le virus est retrouvé dans le cerveau, le cœur, les reins, les poumons, les gonades, le foie, la rate, les intestins, l'œsophage et la peau [Komar et al., 2003 ; Steele et al., 2000].

Après infection expérimentale réalisée sur la corneille américaine par la souche NY99, les signes cliniques ont été observés 4 jours après inoculation. Plusieurs symptômes tels que la dépression, l'anorexie, l'incapacité au vol et des désordres à la démarche ont été observés. Des saignements par la bouche et le cloaque ont été rapportés. La mort survient 24 heures après [Weingartl, H. M., al; 2004] [Komar, N., al ; 2003]. Les mêmes signes se sont reproduits chez les autres espèces sensibles. Cependant, les moments d'apparition et le résultat de la maladie sont différents (généralement 4-10 jours après inoculation).

En revanche aucune mortalité n'a été enregistrée chez la poule même suite à une infection avec des charges virales pouvant aller jusqu'à 5log₁₀ PFU/ml de sérum [Brault, 2009]. Le virus est pourtant retrouvé dans le myocarde, le foie, les reins, les poumons et les intestins. Des examens histologiques montrent des lésions de nécrose dans le myocarde, des néphrites, et des congestions pulmonaires [Senne et al., 2000].

Les espèces sensibles présentent des lésions macroscopiques et histopathologiques. On a observé, la congestion du cortex cérébral, la rate (splénomégalie est observée dans plusieurs cas), le cœur et les reins. Des pétéchies au niveau de l'estomac, du foie et des muscles squelettiques; la distension de la vésicule biliaire et l'opacité de sacs d'air ont été aussi rapportées. L'examen histopathologique révèle la présence des hépatocytes nécrosés avec des vacuoles cytoplasmiques, rupture des noyaux et étrange présence des phagocytes mononucléaires dans le tissu. La congestion de la rate et accompagnée par la nécrose de lymphocytes dans ces nœuds lymphatiques ce qui signale la présence d'inflammation cellulaires, en particulier les macrophages du parenchyme splénique. Les fibres des muscles squelettiques sont gonflées avec perte de striation et de fragmentation des sarcomères. On a souvent observé la nécrose de la moelle osseuse [LaDeau, S., al ; 2007].

L'isolement est relativement facile dans les plumes et la peau, augmentant la probabilité de transmission au vecteur. Alors que l'isolement du virus dans les ovaires indique une possibilité de transmission verticale [Komar, N., al ; 2003].

1.1.6. Chez les équidés :

En 1968, le VWN a été le premier arbovirus isolé au Maghreb, à partir d'un lot de *Culex* collectés dans l'extrême sud du Sahara algérien [Pilo-Moron et al., 1970]. En 1996, il a été de nouveau isolé chez le cheval au Maroc. Entre temps des enquêtes séro-épidémiologique réalisées chez les petits mammifères sauvages (*Mus musculus*, *M. spretus*, *Rattus rattus*, *Eliomys tunetae*, *Ctenodactylus gundi* et *Pipistrellus kunli*) ne laissent aucun doute sur sa circulation en Algérie, au Maroc et en Tunisie [Chastel et al., 1977].

En aout 2010, l'office International des Épizooties (OIE) a émis un rapport de notification immédiate suite à la déclaration de 5 foyers de FWN, dans la région de Macédoine centrale au Nord de la Grèce (Thessalonique) : 6 chevaux sur 18 ont présenté des signes cliniques. Un autre bulletin d'alerte a concerné l'émergence de cas de FWN en Italie. Sur 59 chevaux présents dans 5 foyers, 13 ont présenté des signes cliniques et un a été euthanasié. Un troisième bulletin d'alerte était relatif à une émergence de FWN en Espagne : en Andalousie sur les 7 chevaux présents, 2 ont présenté des signes cliniques. Dans la même période seize foyers équins ont été identifiés au Maroc essentiellement dans la région de Benslimane. Sur 111 chevaux, 17 ont présenté des signes cliniques et 8 sont morts.

Les infections chez les équidés (cheval, âne, mule) sont similaires aux infections humaines (Dauphin et Zientara, 2007). Comme chez l'Homme, des signes cliniques ne sont observés que sur une faible proportion d'individus (environ 10%) [Petersen et Roehrig, 2001].

Les signes cliniques rapportés chez les chevaux incluent la fièvre, la paraparésie ou tetraparésie et l'ataxie qui peut être symétrique ou asymétrique, le décubitus et des signes évidents d'une maladie intracrânienne comprenant une ataxie vestibulaire ou cérébrale et des changements de comportement [Cantile, C., al ; 2000] [Venter, M., al 2009] [Kutasi, O., al ; 2011] [Steinman, A., al ; 2000]. Les signes ne sont pas pathognomoniques de

l'infection à VWN. Dans beaucoup des cas cliniques d'infection, les chevaux montrent fréquemment la fasciculation et des tremblements [Cantile, C., al ; 2000] [Venter, M., al 2009]. Les signes cliniques les plus communs étaient l'ataxie, des désordres à la démarche, de la fasciculation musculaire, une dépression et un décubitus [Ng, T., al 2003].

La sévérité des signes cliniques dépend de plusieurs facteurs dont : l'âge, les méthodes d'élevage, la virulence de la souche, les conditions de stabulation, la sensibilité génétique, et des infections précédentes à d'autres flavivirus [Autorino et al., 2002 ; Steinman et al., 2002 ; Tesh et al., 2002a].

CHAPITRE 2 :

Epidémiologie

2. Chapitre 2 : Epidémiologie

Répartition mondiale

Des cas sporadiques et des épidémies de FWN chez l'homme et les équidés ont été rapportés après la découverte de VWN en 1937 en Ouganda. Dans les années 1990, une augmentation de l'activité du VWN a été observée, avec d'importantes épidémies en Europe : Roumanie (1996), Russie (1999) et bassin méditerranéen (1994, 1997, 1998, 2000), avec des centaines de cas humains [Murgue et al., 2001]. Le virus a également été introduit aux Etats-Unis en 1999 où il a causé une importante épidémie et épizootie, et s'est étendu progressivement vers le Canada, l'Argentine et le Brésil [Randolph et Rogers, 2010]. A partir des années 2000, une circulation de plus en plus forte du VWN a été observée en Europe centrale et dans le bassin méditerranéen, avec des épidémies importantes en Albanie, en Hongrie, en Israël, en Italie, en Macédoine, dans le territoire palestinien, en Roumanie, en Fédération de Russie, en Serbie, en Espagne, en Ukraine, en Tunisie, en Turquie, et en Grèce (2010-2012) [Calistri et al., 2010, Sirbu et al., 2011].

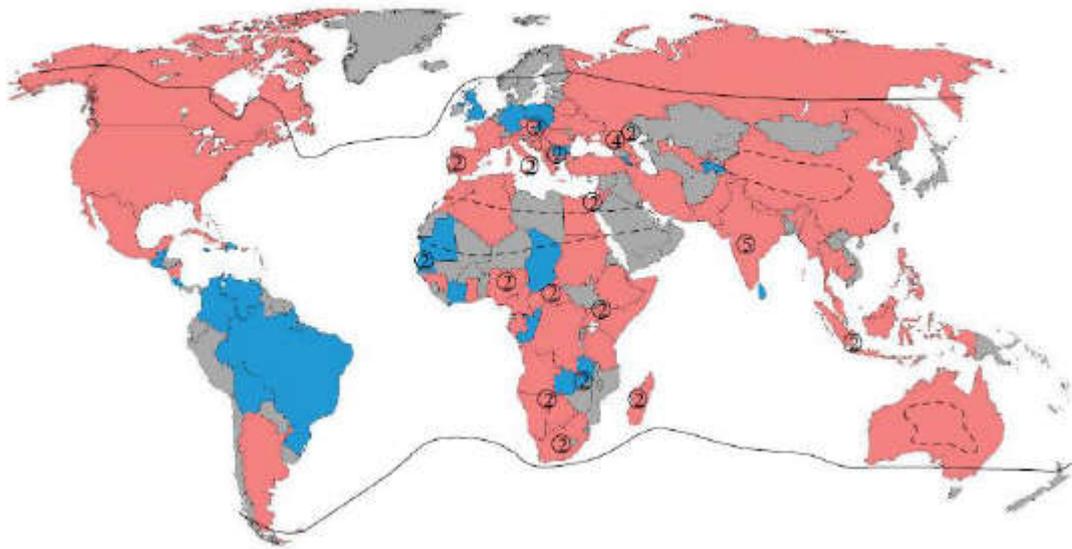


Figure 2.1 : Distribution globale du virus West Nile dans le monde : le rouge – des cas humain ou de séropositivité humaine, bleu – cas non humain/moustique, gris – absence de données ou rapport négatif, la ligne noire – représente la distribution mondiale de vecteur du VWN. Les pays encerclés indiquent la présence de lignages du VNW que le lignage 1. [Chancey, C., al ; 2015].

Lignages et souches : Phylogéographie

L'analyse de la séquence nucléotidique de génome viral à partir des gènes codants pour la protéine E ou NS 5, ou bien le séquençage du génome viral complet ont permis d'identification plus clairement les relations et les distances entre les souches virales et définir la notion de lignage des virus [Castillo-Olivares, J. K. L., al ; 2011].

Les analyses phylogénétiques s'appuyant sur le séquençage des ARN viraux et la comparaison des séquences obtenues, montrent une variabilité génétique 60 entre les souches de VWN et peuvent être classées en sept lignages dont les séquences peuvent diverger de 25% à 30% [Lanciotti, R.S., al ; 1999] [May, F.J., al ; 2011] [Papa, A., al ; 2011] (Figure 2.2).

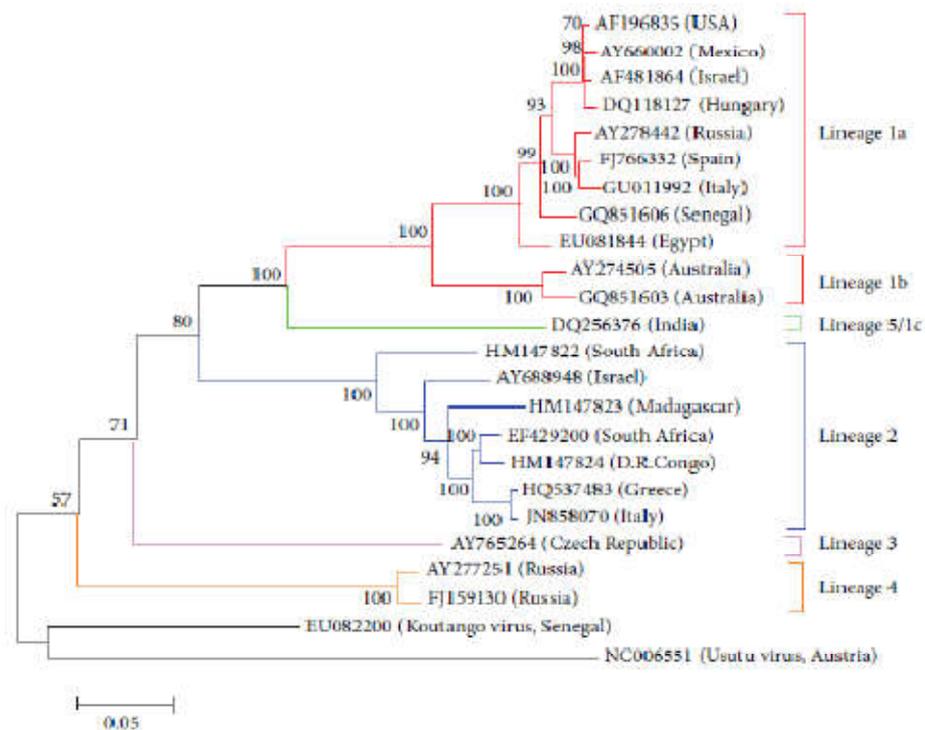


Figure 2.2 : les lignages majeurs du VWN [Chancey, C., al ; 2015]. La figure suivante représente la répartition géographique des différentes souches de VWN.

Les VWN appartenant au lignage 1 présentent la distribution géographique la plus large et ont été décrits en Afrique de l'Ouest, au Moyen Orient, en Europe du Sud, en Europe centrale, en Amérique et en Australie. Ils ont été à l'origine de la majorité des épidémies jusqu'en 2008 [Calistri et al., 2010]. Le lignage peut être divisé en 3 clusters : le premier

regroupe les isolats de l'Inde, le second correspond au virus Kunjin isolé en Australie, et le troisième représente les virus isolés en Europe, Afrique et au Moyen Orient [Lanciotti et al., 2002, Lanciotti et al., 1999] ; Burt et al., 2002 ; [Beasley et al., 2004] (Figure 2.3 et Figure 2.4). Les VWN de lignage 2, initialement isolés en Afrique (Sénégal, Ouganda, République centrafricaine, Kenya et Madagascar), ont probablement été introduits en Europe centrale par les oiseaux migrateurs venant d'Afrique en 2004 [Bakonyi et al., 2006]

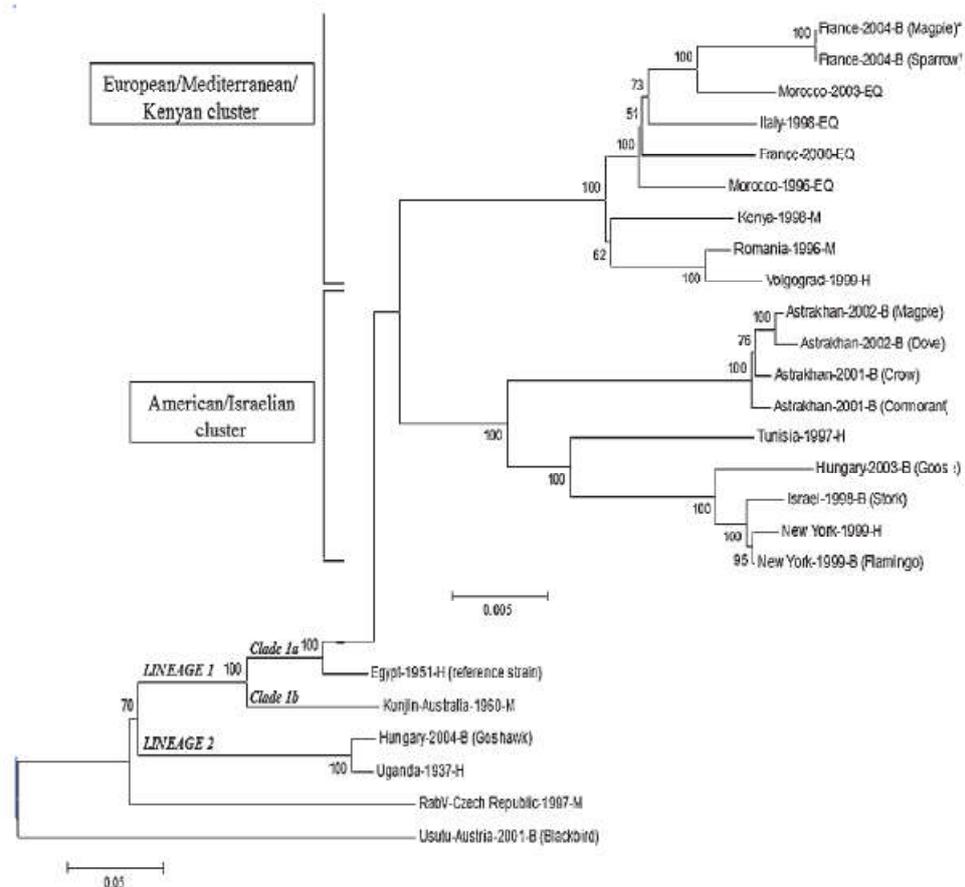


Figure 2.3 : Arbre phylogénétique des virus West Nile basé sur le séquençage complet du génome virale et montrant les groupes 1a et 1b (lignage 1) et le lignage 2 [Jourdain et al., 2007b].

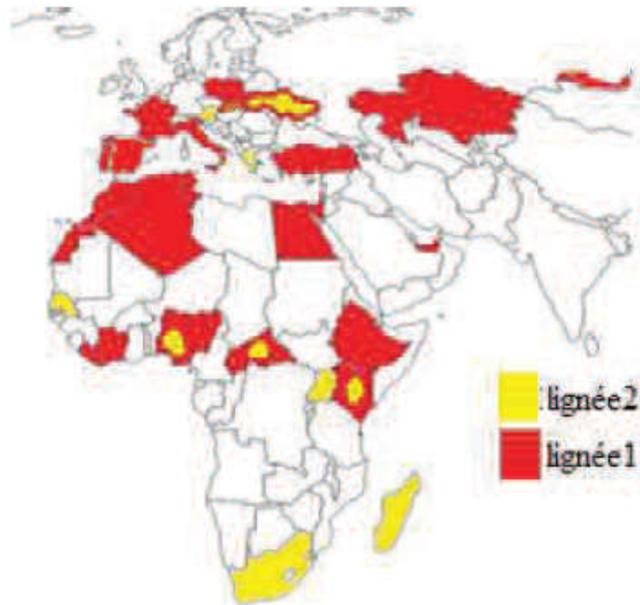


Figure 2.4 : Répartition géographique des virus West Nile de lignées 1 et 2.

Le lignage 3 a été isolé pour la première fois près des frontières Autrichienne et Tchèque république en 1997. Le lignage 3 dénommé aussi virus Rabenburg par rapport à la ville Autrichienne à proximité où on a effectué la première isolation de virus sur un *Culex pipiens* infecté [Bakonyi, T., al ; 2005] [Hubálek, Z., al ; 1998]. En basant sur la diversité génomique et antigénique, il a été suggéré de classer le virus Rabenburg comme une nouvelle espèce dans le séro groupe de l'encéphalite japonaise [Bakonyi, T., al ; 2005]. Ce lignage n'a pas isolé chez l'homme et son potentiel pathogène reste incertain [Barzon, L., al ; 2013]. Les virus de lignage 4 (LEIVKmd88-190) circulent en Russie depuis au moins 1988. Isolé à partir d'une tique (*Dermacentor marginatus*) dans le sud ouest de la région du Caucase de la Russie en 1998 [Barzon, L., al ; 2013]. Le lignage 5 représente la nouvelle classification de cluster 1c de Lignage 1. Le lignage 6 est proposé pour le virus isolé de *C. pipiens* dans le sud de l'Espagne en 2006. Il est très étroitement lié au lignage 4 [Vazquez, A., al ; 2010]. Un 7ème lignage est suggéré pour le virus africain Koutango, qui est très proche de VWN [Mackenzie, T.S., al ; 2009].

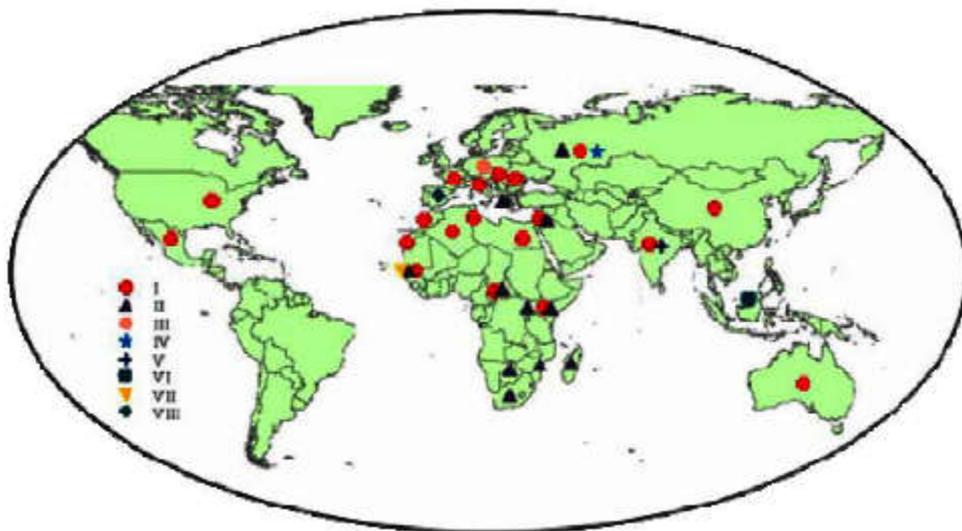


Figure 2.5 Distribution géographique des différents lignages du VWN [Ahmadnejad, F., al ; 2006].

Cycle de transmission

Le cycle de transmission du VWN est complexe car il fait intervenir de nombreux acteurs. L'amplification du virus (cycle enzootique) s'effectue entre oiseaux et moustiques ornithophiles, principalement du genre *Culex*. Un passage accidentel (épizootique) peut se produire entre des « moustiques passerelles » (en anglais : bridge species), aux préférences trophiques opportunistes (à la fois ornithophiles et mammophiles) et des mammifères (hommes et équidés) qui sont considérés comme des culs de sacs épidémiologiques car leur virémie est courte et de faible amplitude et elle ne permet pas d'infecter les moustiques vecteurs potentiels.

Plusieurs autres espèces de mammifères (y compris des mammifères sauvages et domestiques) ont été décrites sensible à l'infection, avec ou sans signes évidents d'infection. On peut citer à titre d'exemple le chat, le chien, le mouton, le porc, les vaches, les lapins, les lamas, cerfs, l'alpaga, le raton laveur, les ourses, les loups, les écureuils...etc [Beasley, D. W., al ; 2005] [Blitvich, B.J., al ; 2008]. Comme chez l'homme et les chevaux la virémie chez les autres mammifères reste inférieure au seuil qui permet l'initiation du cycle.

Les moustiques s'infectent lors d'un repas sanguin en ingérant le virus (figure 12). Après passage à travers la barrière intestinale, le virus se réplique localement puis atteint les glandes salivaires pour ensuite être transmis lors d'un repas sanguin ultérieur. Cette dernière étape est directement liée aux conditions climatiques (température, hygrométrie...), qui sont déterminantes en termes d'activité des vecteurs et de durée de transmission. De nombreuses espèces de moustiques, de genres différents (*Culex*, *Aedes*, *Anopheles*, *Mansonia*...) ont été trouvées porteuses du VWN [Hayes et al., 2005].

Au moins 60 espèces de moustiques de 11 genres différents ont été décrites en tant que vecteurs compétents dans le nord de l'Amérique. Les plus efficaces sont les espèces de genre *Culex* (*Cx. pipiens*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. restuans*, *Cx. salinarius*, *Cx. tarsalis* et *Cx. nigripalpus*) d'autres espèces telles que *Aedes albopictus*, *Aedes vexans*, *Orchlerotatus japonicus* et *orchlerotatus triseriatus* peuvent jouer le rôle vecteur dans le cycle et transmettre le virus aux mammifères [Brault, A.C., al ; 2009]. En Europe le virus est isolé dans plus de 40 espèces différentes, la majorité appartient au genre *Culex*. Plusieurs d'autres espèces ont été également décrites comme vecteurs compétents : *Cx. univittatus* en Afrique, *Cx. annulirostris* en Australie, et *Cx. visnui* et *Cx. tritaeniorhynchus* en Asie [Brault, A.C., al ; 2009] [Hayes, E. B., al ; 2005] [Hall, R.A., al ; 2002].

La transmission verticale est supposée entre les moustiques. La transmission trans-ovarienne naturelle de VWN a été identifiée chez *Cx. univittatus* au Kenya. En outre des études de laboratoires, sur des espèces de *Culex* et *Aedes* ont montré une transmission à la progéniture [Baqar, S., al ; 1993] [Miller, B.R., al ; 2000] [Turell, M.J., al ; 2001]. La transmission entre moustiques a été également documentée [Higgs, S., al ; 2005].

Le niveau de virémie varie selon les espèces d'oiseaux et sa durée est assez courte (de l'ordre de quelques jours) : ainsi, les passériformes (passereaux), les charadriiformes (oiseaux aquatiques), les strigiformes (rapaces nocturnes) et les falconiformes (rapaces diurnes) présentent des niveaux de virémie généralement suffisants pour infecter la plupart des moustiques. Par contre, les columbiformes, les piciformes (piverts) et ansériformes (canards etc...), généralement résistants à l'infection, développent une virémie faible [Komar et al., 2003]. Les oiseaux sont considérés comme de bons agents disséminateurs du VWN

dans la mesure où ils peuvent parcourir de grandes distances lors des migrations **[Sotelo et al., 2009]**.

Les analyses de laboratoires ont montré que *Cx. tarsalis* devient infectant après un repas sanguin de concentration virale de 10⁷ UFL/ml. Cependant, seulement 30% sont infectants si la concentration est de 10⁵ UFL/ml. Les moustiques inoculent des doses virales variables dans les hôtes vertébrés pendant l'alimentation, environ 10² UFL sont directement inoculées dans le sang **[Styer, L.M., al ; 2007]**.

Plus la population locale de moustiques a une faible compétence vectorielle à l'infection par le VWN, plus il est primordial pour le virus d'atteindre une virémie forte chez son hôte, ce qui est le cas pour certaines espèces américaines de *Culex spp.* Inversement, les vecteurs sensibles au VWN peuvent transmettre efficacement le virus même lorsque la virémie aviaire est plus faible, ce qui est le cas dans les régions endémiques (Afrique, Europe...) **[Brault et al., 2009]**.

En absence des moustiques, le cycle oiseaux-tiques est proposé pour expliquer l'infection par le VWN des populations de goélands argentés (*Larus argentatus*) infestés par *C. capensis* dans des îles de la mer Caspienne **[Lvol, D.K., al ; 1987]**. Le cycle oiseaux-tiques est aussi suspecté en Israël **[Mumcuoglu, K.Y., al ; 2005]**. Enfin, la longue vie des tiques molles pourrait permettre une persistance du VWN de façon localisée dans certains foyers **[Diamond, M. S., al ; 2009]**.

Les oiseaux sont les réservoirs naturels de VWN. L'infection dans plusieurs espèces d'oiseaux sauvages produit un niveau de virémie suffisant pour infecter le vecteur **[Work, T.H., al ; 1955]**. Ce sont sans doute les oiseaux qui sont à l'origine de l'introduction du VWN à partir de l'Afrique sub-saharienne vers l'Europe et la région méditerranéenne **[Berthet et al., 1997; Charrel et al., 2003; Jourdain et al., 2007]**. Depuis la découverte du virus en 1937, aucune mortalité aviaire naturelle n'avait été rapportée **[Hayes et al., 1988]**, jusqu'aux foyers de la fin des années 1990 en Israël et aux Etats-Unis **[Bernard et al., 2001 ; Bin et al., 2001 ; Swayne et al., 2001]**. En 1998, le VWN est isolé à partir d'une cigogne moribonde trouvée en Israël **[Malkinson et al., 2001b]**. Des mortalités élevées chez les jeunes oiseaux de 3 à 8 semaines étaient observées dans des populations de cigognes et d'oies **[Malkinson et al., 2001a]**. Aux Etats-Unis, beaucoup d'oiseaux et en particulier le Quiscale bronzé

(*Quiscalus quiscula*), le Corbeau Américain (*Corvus brachyrhynchos*), le geai bleu (*Cyanocitta cristata*), la pie (*Pica pica*), le roselin (*Carpodacus mexicanus*) et le moineau (*Passer domesticus*) ont été sévèrement touchés par l'épidémie/épizootie et ont permis une amplification efficace du virus [Hayes et al., 2005]. Les passériformes et en particulier les corvidés sont hautement sensibles à l'infection [Komar et al., 2003].

Des infections expérimentales réalisées sur de jeunes oies avec un isolat nord-américain ont permis d'observer des taux de mortalité similaires à ce qui est observé dans la nature avec des virémies suffisantes pour infecter les moustiques [Swayne et al., 2001]. La virulence d'un isolat nord-américain a été évaluée sur 25 espèces aviaires américaines. Parmi ces espèces, les corvidés dont le corbeau américain (AMCR, pour AMERICAN CRow) et le geai bleu (*Cyanocitta cristata*), présentent une virémie comprise entre 8 et 10 log₁₀ PFU/ml [Komar et al., 2003]. Les espèces sensibles présentent de fortes virémies et des taux de mortalité élevés [Ladeau et al., 2007].

Enfin une augmentation des signes pathologiques pourraient avantager l'infection des moustiques suite à une baisse des comportements de défense des oiseaux contre les moustiques [Day et Edman, 1983]. De plus, les moustiques pourraient être davantage attirés par des oiseaux en hyperthermie [Kinney et al., 2006].

En dehors des mammifères et oiseaux, plusieurs reptiles et amphibiens tels que les serpents, crocodiles, alligators et les grenouilles [Kostiukov, MA., al ; 1985] [Steinman, A., al ; 2006] ont été également décrits comme sensibles et certains d'entre eux développent une virémie élevée. Cependant, leur rôle dans l'entretien de la maladie dans la nature reste encore incertain [Martín-Acebes, M.A., al ; 2012].

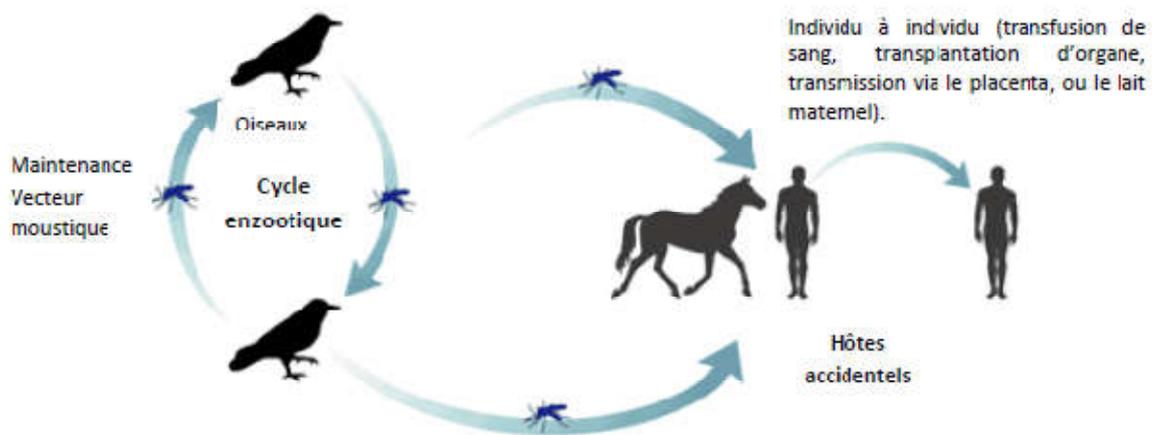


Figure 2.6 : Cycle de transmission du virus West Nile (d'après Huhn et al. 2003).

La situation de la maladie en Algérie

2.1.1. Donnés historiques sur la maladie

2.1.1.1. Isolement de virus

Après son isolement à l'institut Pasteur d'Alger en 1968 à partir d'un broyat de vecteurs constitué d'un pool de 215 moustiques du genre *Culex* prélevés dans la région de Djanet, localité située à l'extrême sud-est de l'Algérie, dans le cadre d'une enquête sur l'épidémie de la peste équine survenue en Algérie en 1965 [Metallaoui, A., al ; 2008].

Le virus de la fièvre du Nil occidental a été identifié la même année par l'institut Pasteur de Dakar [Travaux Estéban Pilo-Moron, Jean Vincent et Vernnick le Corrolier – Archives Institut Pasteur d'Alger].

Depuis, toutes les tentatives d'isolement du virus n'ont pas abouti, que se soit à partir des êtres humains ou à partir des animaux. Par exemple, en 1975, un nombre indéterminé de vecteur (genre *Culex*), 189 oiseaux et 19 rongeurs ont servi à une tentative d'isolement du virus mais en vain, tous les résultats se sont révélés négatifs.

2.1.2. Enquêtes sérologiques sur la fièvre du nil occidental

❖ Chez l'homme :

Si sur le plan clinique, la West Nile n'a pas été décrite chez les humains malgré l'isolement du virus à partir des moustiques en 1968, la circulation de son virus a été déjà suspectée dès 1968 par séroneutralisation effectuée sur 9 sérums humains dont deux se sont révélés positifs à un arbovirus (virus WN non identifié) **[Metallaoui, A., 2008]**.

Dès 1973, et dans plusieurs régions du sud et intermédiaires entre le sud et le nord, les enquêtes sérologiques menées chez les humains ont bien mis en évidence la circulation du virus de WN **[Metallaoui, A., 2008]**.

En 1994, dans le sud ouest algérien (Timimoun, wilaya d'Adrar), il a été décrit des symptômes pouvant être rattachés à un tableau clinique de la fièvre WN sur une cinquantaine de personnes. Les malades ont présenté une forte fièvre associée à des symptômes neurologiques, quelques cas avec un état comateux. 20 patients ont présenté des atteintes céphaliques, parmi ces personnes huit sont décédées. La sérologie pratiquée sur 08 personnes a donné des résultats positifs de 83,3% **[Metallaoui, A., 2008]**.

❖ Chez les animaux :

Une seule enquête sérologique a été menée en 1975, dans les oasis de localité de Djanet sur des ânes sauvages, des oiseaux et des rongeurs et qui abouti aux résultats rapportés sur le tableau 2.2 **[Metallaoui, A., 2008]**.

Tableau 2.1 : Récapitulatif des enquêtes sérologique menées en Algérie [A. Benjelloun et al., 2015].

Années	Région	Nbr de sérums testés	Résultats
1965 (Metallaoui, 2008)	Nord de l'Algérie	281	P= 0%
1973 (Metallaoui, 2008)	Djanet (Illizi)	171	P= 14,6%
1975 (Metallaoui, 2008)	Illizi et Djanet	48	P= 58,3%
	Tamanrasset	143	P= 3,5%
1976 (Metallaoui, 2008)	Biskra	24	P= 37,5%
	Ouled Djellal	21	P= 19%
1994 (Pradier, 2012)	Timimoun	18	P= 83,3% 2 cas douteux non comptabilisés
2012 (EpiSouth, 2012)	Jijel	1 cas	1 cas

Tableau 2.2 : Enquête sérologique West Nile, 1975, Djanet [Source : Revue medicopharmaceutique N°48, les arbovirus qui menacent l'Algérie].

Animaux	Nbr de sérums testés	Résultats (observation)
Ânes sauvages	52	p = 96,6% Non spécifique à VW
Oiseaux-Rongeurs	131	0 cas

2.1.3. Systeme de surveillance :

La WN en Algérie est une maladie à déclaration obligatoire (décrit exécutif n° 95-66 du 22 Ramadhan 1415 correspondant au 22 février 1995 fixant la liste des maladies animales à déclarations obligatoires et les mesures générales qui leurs sont applicables) [Ouadahi F., al; 2011]. Ce qui fait que le système d'épidémiologie-surveillance intègre plus de sept mille vétérinaires praticiens et fonctionnaires convenablement répartis à travers la totalité du territoire national, mais jusqu'à présent sans surveillance active contre cette maladie vectorielle.

CHAPITRE 3 :

Etude expérimentale

3. Chapitre III : Etude expérimentale

Matériel et méthodes :

3.1.1. Protocole de l'enquête :

3.1.1.1. Problématique et objectif :

En bassin méditerranéen tout comme le vieux monde, le virus West Nile est considéré comme ré-émergent [Murgue, b., al ; 1950-2000, Ann, N. Y. 2001]. En Algérie, son premier isolement remonte à 1968 lors d'une enquête sur la peste équine dans la région de Djanet [Metallaoui, A., 2008]. Dans les années soixante-dix, plusieurs enquêtes chez l'homme ont révélé une faible prévalence vis-à-vis du virus. En 1994, une épidémie au virus West Nile est survenue dans le pays faisant une cinquantaine de victimes et huit personnes ont succombé à la maladie [Metallaoui, A., 2008]. Depuis cette date, peu de données sont disponibles sur ce virus en Algérie, alors que la maladie est réapparue à maintes reprises dans les pays limitrophes (en Tunisie, durant les années 2007, 2010, 2011, 2013 et au Maroc, en 2003 et en 2010) et dans la méditerranée.

L'ensemble de ces facteurs rendent l'épidémiologie de cette arbovirose complexe, si on tient compte aussi de l'absence d'un réseau de surveillance spécifique et actif de cette maladie dans nos territoires. Notre travail est destiné à faire le point sur la situation actuelle du VWN chez une certaine catégorie d'oiseaux sédentaire en Algérie avec pour objectifs:

- 1) **Evaluer la situation sanitaire de la fièvre du nil occidental chez l'amplificateur dans la wilaya de Bouira et de Tizi-Ouzou.**
- 2) **Etudier le risque de réémergence de cette maladie par l'intermédiaire d'oiseaux sédentaires.**

Pour atteindre ces objectifs, nous avons tenté de répondre aux questions suivantes:

- **Quelle est la situation épidémiologique du virus du west nile en Algérie?**
- **Le virus West Nile circule-t-il en Algérie et de quelle façon?**

- **Les oiseaux sédentaires présentent-ils un risque potentiel dans la répartition de cette arbovirose?**

3.1.1.2. Localisation géographique de la zone d'étude:

Raffour est un village de la Kabylie, situé dans la commune de M'Chedallah, à quelques kilomètres du centre la wilaya de Bouira, en Algérie. Appelé Iwaquren en langue kabyle, il portait le nom de *Les Toiles (souvent confondu avec l'étoile)* avant l'indépendance du pays.

Il est situé entre 36° 21' 09" nord, 4° 17' 13" est, limité au Nord par le Parc national de Djurdjura, à l'Est par le village de Chorfa (Wilaya de Bouira), au Sud par le village de Ath Mensour (Wilaya de Bouira) et à l'Ouest par le village Vouaklan (Wilaya de Bouira). (Figure 3.1).

Le climat de la dernière décennie est caractérisé par des étés chauds et des hivers doux mais pluvieux avec un ensoleillement très élevé (**Wikipedia.html**).

La Daïra de Ouaguenoun est une circonscription administrative algérienne située à quelques kilomètres de la wilaya de Tizi-Ouzou. Elle est située entre 36° 46' 12" Nord – 4° 10' 29" Est, limitée au Nord par la daïra de Tigzirt et d'Azeffoun, à l'Est par la Daïra d'Azazga et au Sud par la Daïra de Tizi et à l'Ouest par la Daïra de Makouda (Figure 3.2).

Le climat de la dernière décennie est caractérisé par des étés chauds et des hivers doux mais pluvieux (pluviométrie 500 à 800 mm) avec un ensoleillement très élevé (**Wikipedia.html**).



Figure 3.1 : La région d'étude Raffour (Bouira) [Google-earth].

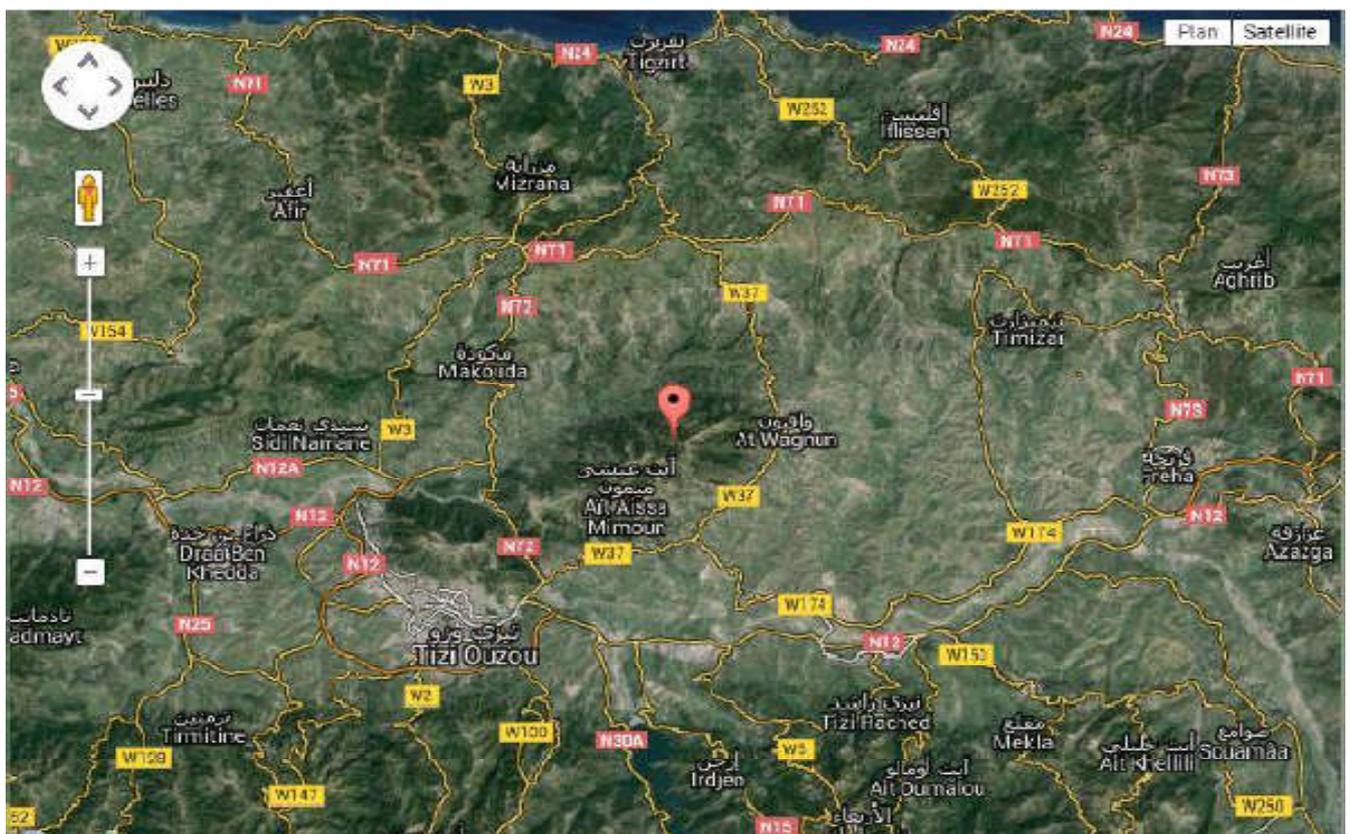


Figure 3.2 : La région d'étude Daïra de Ouaguenoun (Tizi-Ouzou) [Google-earth].

3.1.1.3. Population d'étude :

Oiseaux sédentaires :

Une seule espèce sédentaire et péri-domestique (fréquente à proximité des habitations) à été choisie parmi la liste des oiseaux amplificateurs jouant un rôle clé dans l'émergence du virus West Nile : le moineau domestique « *Passer domesticus* » (Figure 3.3).

Le choix du moineau est basé sur:

(1) Le rôle particulier de cette espèce dans le cycle de transmission du VWN

[Komar, N., al ; 1999, Am. J. Trop. Med. Hyg. V, 2002]

(2) Ces oiseaux sont présents en nombre important autour des habitations et des écuries (lieux où se trouvent les hôtes accidentels).

(3) Relativement facile à capturer.



Figure 3.3 : le moineau «*Passer domesticus*» (photo personnelle 2015).

Oiseaux migrateurs :

La population étudiée est constituée d'une seule espèce de passereaux de la famille des turdidés (*Turdus philomelos*) qui migre en Afrique pour passer l'hiver, en provenance de l'Europe et en traversant la Méditerranée (Figure 3.4).

La restriction de notre étude à une seule espèce migratrice de la famille des turdidés est justifiée par le fait que :

- (1) Cette espèce arrive simultanément et d'une façon massive.
- (2) Facile à capturer en grand nombre comparée aux autres oiseaux migrateurs, candidat à l'introduction du virus.
- (3) Le rôle primordial des passereaux dans la circulation du virus West Nile [Komar, N., 2002].
- (4) Les moyens financiers qui ne permettent pas d'élargir le champ de l'enquête.



Figure 3.4 : la grive « *Turdus philomelos* » (Photo personnelle 2015).

3.1.1.4. Capture des oiseaux et Période d'étude :

Méthode de capture :

Oiseaux sédentaires:

Les moineaux sont capturés à l'aide d'utilisation de filets japonais (Figure 3.5), ou capturer à la main dans l'obscurité (la nuit) au niveau des charpentes des maisons.

Oiseaux migrateurs :

La grive a été capturée par deux méthodes : à l'aide de filets japonais (Figure 3.6) et des petits pièges à ressort (pièges traditionnels).

Choix du site de piégeage :

Les moineaux ont été capturés dans le village situé dans la daïra de M'Chedallah. Dans des sites faciles d'accès (autorisation des propriétaires, facilité de pose des filets).

Période de capture :

La capture des sujets est faite durant la période printanière (Mars – Mai).



Figure 3.5 : Filet japonais placé pour le moineau (Photos personnelles 2015).



Figure 3.6 : Filet japonais pour la grive (Photo personnelle 2017).

3.1.1.5. Définition du cas :

Dans cette étude, un individu est considéré comme positif, si le sérum analysé par le test ELISA compétition IgG WN se montre positif.

3.1.1.6. L'échantillonnage :

Pour pouvoir détecter une séroprévalence minimale de 4%, un minimum de 40 oiseaux dans chaque catégorie étudiée doit être prélevé.

En effet, le nombre minimal d'oiseaux à prélever pour rechercher la maladie dans une population infinie (taux de sondage inférieur à 10%) est de 40 pour une prévalence limite de 4% et un risque d'erreur de 20%.

La taille d'échantillon a été calculée à l'aide de la loi binomial:

$$n = \frac{\ln \alpha}{\ln(1 - p)}$$
$$n = \frac{\ln 0,2}{\ln (1 - 0.04)} = 40$$

3.1.1.7. Traitement des prélèvements:

Méthode de prélèvement :

Le sang est prélevé dans des tubes secs et identifié individuellement après sacrifice des sujets. La quantité du sang recueillie pour le moineau varie entre 1 et 2 ml. Le sang est immédiatement centrifugé (3000 tours / minute pendant 3 minutes) après prélèvement. Les sérums sont transférés dans des tubes à eppendorfs et stockés à – 20° C jusqu'à analyse.

3.1.1.8. Analyses des échantillons :

Les sérums des oiseaux ont été testés par la technique ELISA de type compétition, le kit «ID Screen West Nile compétition» a été utilisé. Les échantillons ont été analysés au niveau de laboratoire de biotechnologie à l'institut des sciences vétérinaire de BLIDA 1.

La technique ELISA de type compétition:

3.1.1.8.1.1. Principe:

La technique ELISA par compétition utilise des anticorps monoclonaux, c'est-à-dire des anticorps produits par des cellules issues d'un clone, qui reconnaissent un seul épitope sur un antigène. Les anticorps monoclonaux viennent se fixer sur les antigènes du test ELISA, laissés libres si le sérum à tester ne contient pas d'anticorps spécifiques du virus WN. Les étapes sont les suivantes:

(1) Un antigène WN est adsorbé sur les puits de la plaque ELISA. Une fois les puits vidés et rincés, les molécules d'Ag restent fixées sur les parois.

(2) Une solution diluée d'anticorps (sérum à tester) est ensuite distribuée dans chaque puits. Les anticorps non fixés sur les antigènes sont éliminés par rinçage. Seuls restent les complexes spécifiques Ag-Ac.

(3) Une solution d'anticorps monoclonaux est ensuite distribuée. Les anticorps monoclonaux se fixent sur les antigènes laissés libres par le sérum testé. Après rinçage, il reste dans chaque puits des complexes Ag-Ac sérique et des complexes Ag-Ac monoclonal.

(4) Un conjugué (solution d'anticorps couplés à une peroxydase) anti-souris est ensuite ajouté. Il vient se fixer sur les anticorps monoclonaux (produits sur souris).

(5) L'ajout d'un substrat, transformé par la peroxydase du conjugué en un produit coloré, permet de révéler les puits contenant les complexes Ag-Ac monoclonal-conjugué. La coloration de chaque puits est mesurée par un spectrophotomètre lecteur de plaques ELISA.

Contrairement aux techniques classiques, un résultat positif est indiqué par une diminution du signal. En effet, la coloration des puits est d'autant plus faible qu'il y a d'anticorps spécifiques du virus WN dans les sérums à tester (puisque ceux-ci empêchent la fixation des anticorps monoclonaux). Un pourcentage d'inhibition est calculé pour chaque puits par rapport à la coloration observée pour les témoins négatifs. Le bruit de fond de chaque sérum est pris en compte par comparaison de l'absorbance des puits coatés avec

l'antigène WN et des puits coatés avec un antigène négatif. La formule utilisée est la suivante :

$$100 - \left(\frac{S - BF}{\sum_i^n (STi - BFi)} \right) \times 100$$

Où S : densité optique (DO) du sérum testé sur Ag WN, BF : bruit de fond correspondant, STi : DO des sérums témoins testés sur Ag-WN, BFi : bruit de fond des sérums témoins.

Un sérum est considéré positif si le pourcentage d'inhibition du puits correspondant est supérieur à 30% [Blitvich et al. 2003] ou 45% [Jozan et al. 2003] selon les auteurs.

3.1.1.8.1.2. Description du kit :

La technique ELISA est une technique sérologique recommandée par l'OIE pour le Virus WN. Aucun mode opératoire spécifique n'est préconisé dans la littérature, la méthode proposée par «ID Screen West Nile Compétition» est alors bien adaptée pour un screening.

Le kit «ID-Screen West Nile compétition» a une sensibilité estimée à 9/10 (90%) par rapport au test de séroneutralisation, en incluant les résultats douteux en ELISA comme résultats positifs et une spécificité à 11/11 c'est-à-dire 100%.

3.1.1.8.1.3. Objectifs et domaines d'application :

Ce test est utilisé en première intention à l'occasion d'analyses sérologiques de routine pour une surveillance sanitaire (surveillances épidémiologiques surtout pour les oiseaux sentinelles) ou pour un certificat d'exportation d'un équidé.

Ce mode opératoire est dérivé de la Notice d'utilisation, WNC ver 0110 FR, incluse dans la trousse commerciale du fabricant ID.Vet (570 rue des Bouissettes, 34070 Montpellier, France).

3.1.1.8.1.4. Appareillage et matériel :

- **micropipettes, monocanales et multi-canales, adaptées aux différents volumes à prélever.**

- **pointes sans filtre ayant été stérilisées, adaptées aux micropipettes utilisées.**
- **spectrophotomètre (lecteur ELISA).**
- **agitateur à microplaques (facultatif).**
- **laveur de microplaques (facultatif).**
- **éventuellement: plaque 96-puits à fond rond ou plat pour réaliser les dilutions des échantillons de sérum à tester.**
- **enceintes réfrigérées: -25°C (± 5°C) et + 5 °C (± 3 °C).**

3.1.1.8.1.5. Réactifs et produits :

3.1.1.8.1.5.1. CONTENU DE LA TROUSSE COMMERCIALE :

- **2 plaques 96 puits, sensibilisées avec l'antigène purifié du virus West-Nile.**
- **1 flacon de conjugué concentré 10X, 3mL.**
- **1 flacon de contrôle positif, prêt à l'emploi, 0,5 ml.**
- **1 flacon de contrôle négatif, prêt à l'emploi, 1 ml.**
- **1 flacon de Tampon de Dilution 2, prêt à l'emploi, 60 ml.**
- **1 flacon de Solution de Lavage concentrée (20x), 60 ml.**
- **1 flacon de Solution de Révélation (chromogène substrat), prête à l'emploi, 60 ml.**
- **1 flacon de Solution d'Arrêt (H2SO4 0,5M), prête à l'emploi, 60 ml.**

3.1.1.8.1.5.2. CONDITIONS DE CONSERVATION :

À la réception et jusqu'à l'ouverture, la trousse commerciale «ID-Screen West Nile Compétition» doit être entreposée à + 5 °C (± 3 °C) en respectant la date limite d'utilisation.

Après ouverture, le conjugué, les contrôles et la solution de révélation doivent être entreposés à + 5 °C (± 3 °C), les autres réactifs (dont les plaques) peuvent être stockés entre + 2 °C et + 26 °C. Par soucis de simplification, l'ensemble de la trousse commerciale entamée est stockée à + 5 °C (± 3 °C).

3.1.1.8.1.5.3. PRECAUTION :

La Solution de Révélation peut être irritante pour la peau. Elle ne doit pas être exposée à une lumière vive ni à des agents oxydants.

Attention, la solution d'arrêt est acide et peut provoquer de graves brûlures. Eviter tout contact avec la peau.

Tous les réactifs doivent être équilibrés à la température ambiante du laboratoire 21°C (\pm 5°C) et homogénéisés par retournement avant utilisation.

3.1.1.8.1.5.4. PREPARATION DE LA SOLUTION DE LAVAGE :

La Solution de Lavage concentrée doit être ramenée à température ambiante 21°C (\pm 5°C) et agitée pour assurer la dissolution des cristaux. Elle est ensuite diluée dans de l'eau distillée/désionisée (non fournie dans la trousse). Un volume total de 1,2 litre peut être préparé à partir d'un flacon.

Pour 1 plaque, pour des lavages réalisés manuellement, préparer 200 ml de Solution de Lavage (10 ml de Solution de Lavage concentrée + 190 ml d'eau).

3.1.1.8.1.6. Préparation des échantillons :

Avant et après utilisation, les échantillons de sérum ou de plasma doivent être conservés à $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Pour réduire la différence des temps d'incubation entre les échantillons, il est possible de préparer une microplaque de 96 puits contenant les échantillons à tester et les échantillons de contrôle, puis de les transférer dans la plaque ELISA avec une pipette multicanale. De plus, l'analyste ne traitera pas plus de 2 plaques ELISA à la fois.

Plan de plaque :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C(+) 1	Echantillon 4	Echantillon 12	Echantillon 20	Echantillon 28	Echantillon 36	Echantillon 44	Echantillon 52	Echantillon 60	Echantillon 68	Echantillon 76	Echantillon 84
B	C(+) 2	Echantillon 5	Echantillon 13	Echantillon 21	Echantillon 29	Echantillon 37	Echantillon 45	Echantillon 53	Echantillon 61	Echantillon 69	Echantillon 77	Echantillon 85
C	C(-) 1	Echantillon 6	Echantillon 14	Echantillon 22	Echantillon 30	Echantillon 38	Echantillon 46	Echantillon 54	Echantillon 62	Echantillon 70	Echantillon 78	Echantillon 86
D	C(-) 2	Echantillon 7	Echantillon 15	Echantillon 23	Echantillon 31	Echantillon 39	Echantillon 47	Echantillon 55	Echantillon 63	Echantillon 71	Echantillon 79	Echantillon 87
E	T + interne competWN	Echantillon 8	Echantillon 16	Echantillon 24	Echantillon 32	Echantillon 40	Echantillon 48	Echantillon 56	Echantillon 64	Echantillon 72	Echantillon 80	Echantillon 88
F	Echantillon 1	Echantillon 9	Echantillon 17	Echantillon 25	Echantillon 33	Echantillon 41	Echantillon 49	Echantillon 57	Echantillon 65	Echantillon 73	Echantillon 81	Echantillon 89
G	Echantillon 2	Echantillon 10	Echantillon 18	Echantillon 26	Echantillon 34	Echantillon 42	Echantillon 50	Echantillon 58	Echantillon 66	Echantillon 74	Echantillon 82	Echantillon 90
H	Echantillon 3	Echantillon 11	Echantillon 19	Echantillon 27	Echantillon 35	Echantillon 43	Echantillon 51	Echantillon 59	Echantillon 67	Echantillon 75	Echantillon 83	Echantillon 91

3.1.1.8.1.7. Mode opératoire :

3.1.1.8.1.7.1. ETAPE DE REPARTITION :

- **Préparer les feuilles de paillasse nécessaires (F P A VIRO VII.01.04 / LSA-FSE-1051-ELISA ID-Screen WN IgG-suivi analytique.doc).**
- **Répartir 50 µl de Tampon de Dilution 2 dans toutes les cupules.**
- **Ajouter 50 µl du contrôle positif dans les cupules A1 et B1: le contrôle positif est donc utilisé deux fois.**

- **Ajouter 50 µl du contrôle négatif dans les cupules C1 et D1: le contrôle négatif est donc utilisé deux fois.**
- **Ajouter 50µL du T+ prévu pour réaliser la carte des contrôles de l'ELISA compétition West Nile dans le puits E1.**
- **Ajouter 50 µl de chaque échantillon à tester dans les cupules restantes. Réaliser des duplicats, lorsque des échantillons douteux ou positifs doivent être re-testés.**
-

3.1.1.8.1.7.2. INCUBATION :

- **incuber pendant 90 min (\pm 6 min) à température ambiante du laboratoire 21°C (\pm 5°C).**

3.1.1.8.1.7.3. LAVAGE :

- **vider la plaque et laver 3 fois avec 300 µl de Solution de Lavage par cupule. Eviter le dessèchement des cupules entre les lavages. Après le dernier lavage, taper fermement la plaque sur du papier absorbant.**

3.1.1.8.1.7.4. ETAPE DE CONJUGUE :

- **préparer la dilution de conjugué en diluant le conjugué 10× au 1/10^{ème} en Tampon de Dilution 2 (pour une plaque: 1 ml de conjugué 10× + 9 ml de Tampon de Dilution 2).**
- **distribuer 100 µl de conjugué 1× dans toutes les cupules utilisées.**
- **Incuber pendant 30 min (\pm 3 min) à température ambiante du laboratoire 21°C (\pm 5°C).**

3.1.1.8.1.7.5. ETAPE DU CHROMOGENE SUBSTRAT :

- **vider la plaque et laver 3 fois avec 300 µl de Solution de Lavage par cupule. Eviter le dessèchement des cupules entre les lavages.**

Après le dernier lavage, taper fermement la plaque sur du papier absorbant.

- **distribuer 100 µl de Solution de Révélation dans toutes les cupules utilisées.**
- **incuber pendant 15 min (± 2 min) à température ambiante du laboratoire 21°C (± 5°C), à l'obscurité (sous une feuille de papier aluminium, par exemple).**
- **ajouter 100 µl de la Solution d'Arrêt dans toutes les cupules utilisées.**
- **homogénéiser par agitation le contenu des cupules avant de mesurer la densité optique (DO) à 450 nm sur un spectrophotomètre (lecteur ELISA).**

3.1.1.8.1.8. Expression des résultats :

3.1.1.8.1.8.1. CALCULS :

- **calculer la moyenne des valeurs de DO des 2 contrôles négatifs = DO_{CN}.**
- **calculer la moyenne des valeurs de DO des 2 contrôles positifs = DO_{CP}.**
- **calculer, pour chaque échantillon, le pourcentage de négativité selon la formule suivante:**

$$\% S/N = \frac{DO_{\text{échantillon}}}{DO_{cn}} \times 100$$

3.1.1.8.1.8.2. VALIDATION DU TEST :

Le test est validé si et seulement si tous les critères suivants sont réunis:

- **la valeur de DO_{CN} doit être supérieure à 0,700 (DO_{CN} > 0,700).**
- **le rapport de la moyenne des contrôles positifs sur la moyenne des contrôles négatifs doit être inférieur à 0,3 (DO_{CP} / DO_{CN} < 0,3).**

- **le coefficient de variation (CV) des contrôles négatifs doit être inférieur à 10% (CVCN < 10%).**

Les différents kits ELISA utilisés pour la détection des anticorps anti-virus West Nile ou peste équine présentent en effet des CV inter-essais proches de 10% (compris entre 9,6% pour le kit ID-Screen West Nile compétition et 14,2% pour le kit Ingezim AHSV Compac Plus).

Néanmoins, si $10 \leq \text{CVCN} \leq 20\%$, le résultat des échantillons pourra être donné, à la condition d'avoir réalisé le calcul du %S/N avec chacune des valeurs des contrôles négatifs et que ce calcul aboutit au même résultat (positif, négatif ou douteux) que celui affiché par la feuille de calcul.

Si l'un de ces critères n'est pas rempli, les échantillons doivent être re-testés.

3.1.1.8.1.8.3. EXPRESSION DES RESULTATS :

- % S/N \leq 40: échantillon positif.
- $40 <$ % S/N \leq 50: échantillon douteux.
- % S/N $>$ 50: échantillon négatif.

Un échantillon donnant un %S/N proche des seuils de positivité ou de négativité définis ci-dessus, avec un statut (positif, négatif ou douteux) qui varie lorsque l'incertitude de l'essai «ID-Screen West Nile Compétition» est prise en compte (l'incertitude a été estimée à 19,2% suivant l'annexe A de la NF U47-019 (CV intra-plaque compris entre 4,6% et 5,5% et CV inter-essais de 9,6%)), sera soumis à un nouvel ELISA (avec échantillon testé en duplicat). Si la même situation est observée, l'échantillon sera considéré comme douteux en ELISA ID-Screen West Nile Compétition.

Les échantillons douteux et positifs nécessitant une confirmation seront soumis à un nouvel ELISA «ID-Screen West Nile Compétition»: les échantillons seront alors testés en duplicats, afin d'obtenir un résultat d'analyse plus précis. Les résultats obtenus au cours de

ce deuxième test seront ceux figurant sur le rapport d'analyse (le résultat final est basé sur la moyenne des densités optiques obtenues pour les duplicats).

Les échantillons positifs feront généralement l'objet d'une recherche d'anticorps IgM dirigés contre le virus West Nile (lorsque le commémoratif atteste de la vaccination de l'animal contre l'infection à virus West Nile, une recherche d'IgM ne sera entreprise que si le vétérinaire ou le propriétaire le demande) (voir MO-VIRO-16), ainsi que d'une confirmation par technique de séroneutralisation West Nile ou par approche Luminex.

Résultats :

3.1.2. Bilan de capture :

31 oiseaux de deux espèces (moineaux et grives) ont été capturés durant la période de piégeage, ces animaux ont été capturés et prélevés dans deux régions différentes dont Tizi-Ouzou (Ouaguenoun) où 23 oiseaux capturés et Bouira (Raffour) où 8 oiseaux capturés.

Tableau 3.1 : Distribution des oiseaux selon la région de capture.

Lieu	Région 1 (Raffour)	Région 2 (Ouaguenoun)
Nombre	8	23
Pourcentage %	25,8	74,2

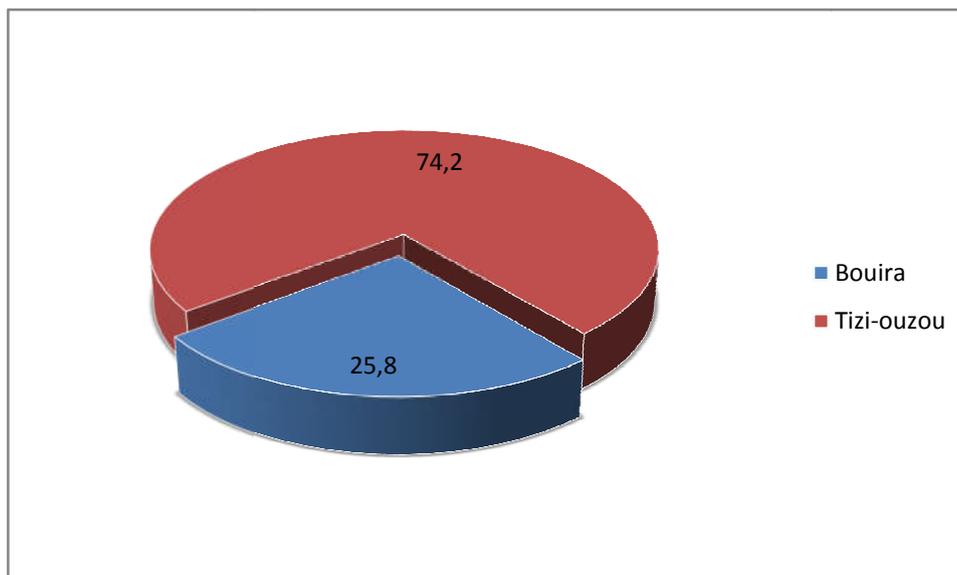


Figure 3.7 : Bilan de capture selon la région.

Résultats sérologique :

3.1.3. Résultats d'ELISA par compétition :

3.1.3.1. Séroprévalence globale :

31 prélèvements ont été préparés pour le test ELISA de type compétition capture IgG, 3 oiseaux se sont montrés séropositifs au test ($S/N \% \leq 50$) ce qui correspond à une séropositivité de 9,67% (3/31) pour la population testés par la technique ELISA. Le tableau et la figure reprennent la séroprévalence globale.

Tableau 3.2 : Résultat global de la sérologie par la technique ELISA.

	Séropositifs	Séronégatif
Nombre	3	28
Pourcentage %	9,67	90,33
Nombre global	31	

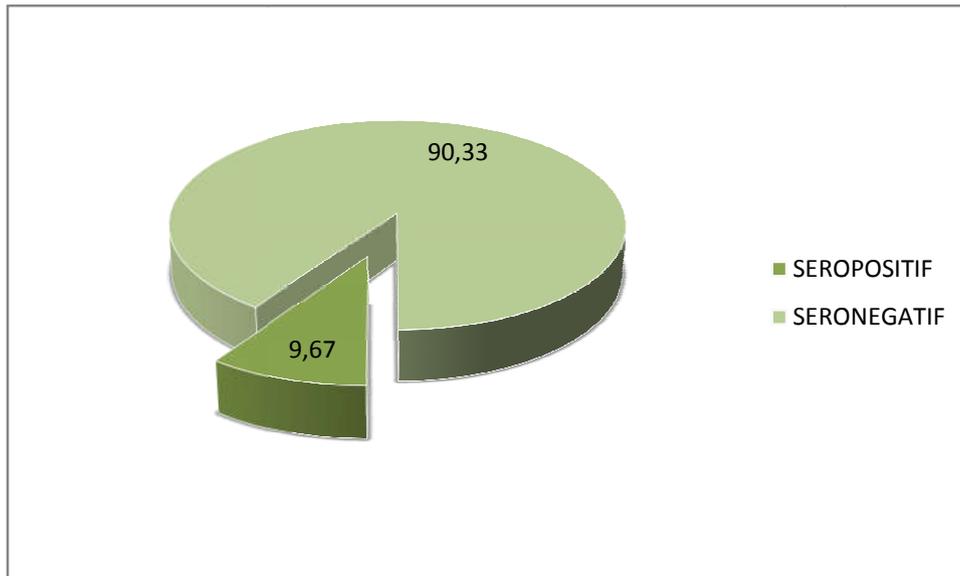


Figure 3.8 : Séroprévalence globale par la technique ELISA.

3.1.3.2. Séroprévalence en fonction de site du capture :

Parmi les 23 sérums d'oiseaux capturés à Tizi-Ouzou 3 se sont montrés séropositifs au test ELISA. Et sur les 8 sérums d'oiseaux capturés au niveau de Bouira aucun n'a montré de séropositivité au test.

Tableau 3.3 : Séropositivité en fonction de site de capture.

	Effectifs	N séropositif	% séropositivité	%séronégativité
Site 1 (Tizi-Ouzou)	23	3	13,04	86,96
Site 2 (Bouira)	8	0	0	100

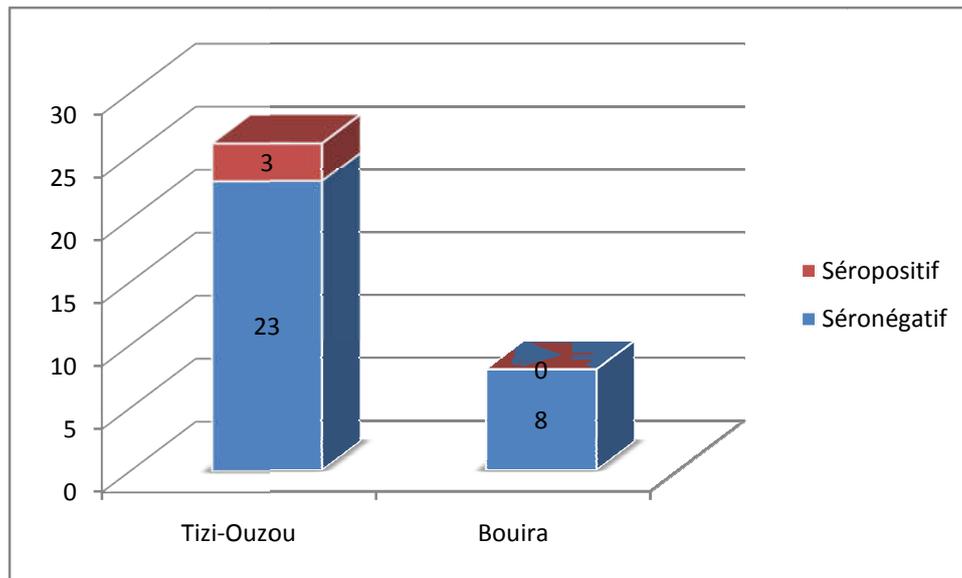


Figure 3.9 : Résultats en fonction du site de capture.

3.1.3.3. Séroprévalence en fonction de l'espèce :

Parmi les 3 oiseaux séropositifs, 100% sont des oiseaux migrateurs (3/3) et 0% sont des oiseaux sédentaires. L'avifaune migratrice semblait la plus touchée que l'espèce sédentaire. (Figure 3.2.6).

Le tableau de contingence ci-après reprend la relation entre la séropositivité en fonction de l'espèce :

Tableau 3.4 : Tableau de contingence donnant la relation séropositivité-espèce.

	La grive	Le moineau	Totale
Séropositif	3	0	3
Séronégatif	20	8	28

Discussion :

3.1.4. Méthode d'échantillonnage :

Ce travail a pour but de détecter des anticorps du virus West Nile chez l'avifaune sauvage (migratrice : la grive et sédentaire : moineau) pour déceler une éventuelle circulation de cette arbovirose dans la région concernée par l'étude. Les prélèvements ont été réalisés en se basant sur un échantillon aléatoire c'est-à-dire en donnant la même

chance pour tous les individus d'être sélectionnés. Cependant, dans le cas de la faune sauvage, le principe de tirage au sort n'est jamais respecté, d'une part freiné par l'impossibilité d'avoir une liste globale de l'ensemble de la population et d'autre part, il existe toujours des biais dits de sélection (technique de piégeage, endroitetc.).

Le choix de la population d'étude est raisonné, deux critères essentiels de sélection ont été pris à savoir : - l'abondance de l'espèce ciblée (pour répondre à la taille de l'échantillon), - la facilité relative de capture (notion de temps) **[Vikolay, B., al ; 2011]**.

Dans cette enquête, la taille de l'échantillon jugée insuffisante pour apprécier la prévalence réelle de la maladie dans la région d'étude. Parmi les facteurs limitant et qui ont conditionné la taille de lot on peut citer le facteur temps et le financement de l'étude (un seul kit ELISA pour deux PFE). Malgré tous ces obstacles ce modeste travail nous a permis d'avoir une idée globale sur la situation épidémiologique de la maladie.

3.1.5. Population d'étude :

Le choix de la population est justifié tout d'abord par le rôle épidémiologique joué par ces deux espèces dans la transmission et la circulation du virus (une virémie important capable d'infecter le vecteur) **[Zeller et Murgue, 2001]**, deuxièmement par l'abondance de ces deux espèces.

Dans le cadre de ce travail, 31 oiseaux ont été inclus. A notre connaissance peu de travaux ont été consacrés à l'étude du VWN chez l'avifaune sauvage en Algérie, cette enquête est parmi les rares orientées dans ce sens.

3.1.6. Méthode de laboratoire (ELISA par compétition) :

La technique ELISA fait partie des épreuves sérologiques recommandées par l'OIE dans le cadre de screening et pour des fins d'épidémiologie-surveillance **[Office international des Epizooties (OIE)]**. Par conséquent, ce test sérologique utilisé était adapté au concept de cette enquête de séroprévalence car il permet de détecter les IgG persistants dans le sérum d'animal plusieurs années après l'infection. La sensibilité de ce test est estimée à 100% comparé au test de référence mais avec une spécificité relativement faible de 79,5%

[Dauphin, G., al ; 2007]. La technique ELISA par compétition présente l'avantage d'être indépendante de l'espèce animale à tester **[Blitvich, B.J., al ; 2003]**. L'inconvénient de cette méthode demeure les réactions croisées avec d'autres flavivirus du même sérocomplexe, notamment avec le virus Usutu qui est largement répandu en Europe et en Afrique **[Vikolay, B., al ; 2011]**. Le test de séroneutralisation est recommandé pour confirmer les résultats.

3.1.7. Résultats de sérologie :

3.1.7.1. Séroprévalence globale :

Le test sérologique a rapporté une séroprévalence globale de 9,67% (3/31) pour cette étude ce que signifiait une faible prévalence endémique dans la région concernée. Ce résultat peut être justifié par le caractère endémique de VWN en Afrique **[Murgue, 2001]** mais aussi par le fait que le virus est signalé à maintes reprises dans les pays voisins de l'Algérie à savoir le Maroc **[Schuffenecker, I.,al ; "West Nile virus in Morocco, 2003", Emerg. Infect. Dis. V. 11, (2005)]**, **[World Animal Health Information Database]** et la Tunisie **[Boubaker, M., al; 2008]** **[Ben Hassine, T., al; 2011]**.

Cette prévalence indiquée par notre enquête pourrait soutenir l'hypothèse de rôle probable des oiseaux migrateurs dans l'introduction du virus et l'importance des oiseaux locaux dans l'amplification. Une hypothèse soutenue par plusieurs auteurs dans de nombreux pays **[Zeller, H., al ; 2004]** ; **[Schuffenecker, I., al ; 2005]** ; **[Figuerola, T., al ; 2007]** ; **[Gangoso, L., al ; 2010]**.

En comparant nos résultats aux récentes enquêtes sérologiques réalisées en Algérie, notre prévalence vient de consolider les taux rapportés par **[Younes-Bouacida N.S., al ; 2013]** et ceux signalés par MEDROUH (2015) et chez les oiseaux migrateurs et sédentaires en Kabylie.

Nos résultats semblaient être très proches de ceux obtenus par les deux auteurs cités en dessus mais à souligner que la taille de notre échantillon ne permet pas de réaliser une comparaison statistique. Notre séroprévalence est également assez similaire à celle obtenue par **[Barros, S.C., al; 2013]** au Portugal qui ont rapporté une séroprévalence de 12,6% chez des oiseaux sauvages et ceux des parcs zoologiques en utilisant le même kit Elisa utilisé dans

cette étude nécessaire pour le screening (ID-Vet). En fin nos résultats semblaient être proches à ceux rapportés par [Llopis, I.V., al ; 2015] en Italie avec une prévalence obtenue de 4,3% chez des oiseaux sauvages malgré que ce dernier a utilisé le test de référence (la séroneutralisation).

3.1.7.2. Séropositivité en fonction du site de capture :

Les résultats montrent qu'il y a une différence statistiquement significative entre le site de capture et la séropositivité (Test exact de Fisher donne une valeur p inférieure à 0,05). En effet, nous avons enregistré un taux de 13,04% pour le site de Tizi-Ouzou et 0% pour le site à Bouira. La distribution des individus pourrait être à l'origine de cette fluctuation (74,2 % de l'échantillon à Tizi-Ouzou).

Dans cette enquête, le site de capture peut s'agir d'un facteur de risque mais la taille réduite de notre échantillon laisse considérer avec prudence ce constat, des études à grand échelle pouvant le confirmer ou l'infirmer. Ce constat corrobore avec les résultats rapportés par [Diaz et al., 2008] ces derniers mentionnent une différence significative entre les sites de capture, cette différence a été expliquée par les variations climatiques entre les lieux de capture.

3.1.7.3. Séropositivité en fonction de l'espèce :

Au terme de notre travail, nous avons enregistré un taux de séropositivité dans la population migratrice de 13,33% contre 6,25% chez l'espèce sédentaire. La présence des anticorps anti VWN chez les deux espèces suggérait une circulation du virus produite localement chez le moineau. Les suivis des oiseaux sentinelles et des enquêtes d'épidémiologies moléculaires pouvaient identifier l'origine du virus circulant en Algérie.

Le test exact de Fisher a montré que le risque d'être infecté est le même quelle que soit l'espèce migratrice ou sédentaire. Ces résultats sont différents de ceux rapportés en Tunisie par [Bargaoui, R., al ; 2012] : 24% pour les espèces migratrices contre 5% pour les espèces pré et domestiques. Cependant, [Figuerola, T., al ; 2008] en Espagne n'ont pas

démontré une différence significative entre les espèces sédentaires (3,32% +/- 8,13) et migratrices (5,23% +/- 7,41).

CONCLUSION

Conclusion

Depuis l'épidémie de Timimoun dans les années 90, l'épidémiologie du virus West Nile reste dans le domaine de l'obscur en Algérie et peu d'enquêtes sont consacrées. Bien

que cette arbovirose soit classée comme une maladie à déclaration obligatoire pour l'avifaune.

Ce présent travail nous a permis d'avoir une idée générale sur la situation du virus West Nile au sein de deux régions à savoir Tizi-Ouzou et Bouira chez deux espèces d'oiseaux sauvages. Le test de laboratoire a permis de déceler une faible prévalence globale de l'ordre de 9,67% dans la population ciblée, avec des taux de séropositivité de 13,33% et de 6,25% respectivement chez la grive et le moineau.

Malgré que la prévalence de notre étude s'avère faible chez l'amplificateur de la maladie, le risque de réémergence restait possible vu sur avec tout les changements climatiques et environnementaux de monde actuel.

Enfin cette enquête a montré que le site de capture pouvait d'être un facteur de risque. Il en ressort que la région de Tizi-Ouzou est plus touchée. Concernant l'espèce aucun lien statistique entre cette variable et le taux de séropositivité.

Recommandation et Perspectives

Dans les pays indemnes ou bien dans les pays où le VWN est endémique ; l'introduction de nouvelles souches plus virulentes pourrai provoquer des épizooties chez les équidés, à l'image de l'épizootie rapportée au Maroc, en 2003 (**Schuffenecker L.al ;2005**) ou en Afrique du Sud (**Venter M.al ;2009**) ; ou des cas graves chez l'homme à l'exemple de l'épidémie de la Roumanie en 1996 (**Sabatino D.D., al., 2014**) ou en Italie en 2008 (**Sabatino D.D.al ;2014**) ; (**Lelli R., al ;2011**) ou enfin celle de Grèce par la lignée 2 en 2010 (**Papa A.al ;2011**).

Par conséquent, il est nécessaire de concevoir et mettre en œuvre un système complet de surveillance de la FWN en Algérie ; sur le long terme qui implique de nombreux acteurs de santé animale et santé publique.

- **Surveillance passive :**

Le système de surveillance passive peut se baser sur quatre maillons de la chaîne mise en œuvre en période d'activité du vecteur :

Humain : surveillance des cas humains d'encéphalites dans les établissements hospitaliers des zones à risque de circulation du VWN en Algérie (les endroits proches des zones humides, des marécages...etc.).

Equin : la surveillance des cas cliniques d'encéphalite équine, repose sur la déclaration obligatoire, sur l'ensemble du territoire, de toute suspicion d'encéphalite par les vétérinaires sanitaires auprès de la direction générale des services vétérinaires.

Le volet équin repose avant tout sur la vigilance des vétérinaires praticiens et la rapidité des laboratoires à établir un diagnostic de certitude. Jusqu'à présent, les vétérinaires praticiens négligent le virus WN devant les tableaux cliniques d'encéphalites ou méningo-encéphalites.

Aviaire : la surveillance passive de la circulation du VWN dans l'avifaune est basée sur un suivi des surmortalités aviaires et ciblée dans les zones et sur des périodes à risque. Elle consiste à rechercher le VWN sur les encéphales des cadavres d'oiseaux sauvages collectés par les services forestiers.

Volet entomologique : la surveillance entomologique consiste à faire l'inventaire des espèces culicidiennes et une recherche du VWN chez les moustiques capturés autour des foyers équins et humains, ainsi que l'établissement des mesures de lutte anti-vectorielle et minimiser la propagation du virus.

- **Surveillance active :**

- Des enquêtes sur le terrain basées sur le suivi sérologique régulier de sentinelles aviaires (Oiseaux captifs, volailles domestiques ou oiseaux sauvages identifiés) ou équines doivent être menées pour connaître la situation de l'infection.

- L'établissement, autour de chaque foyer, d'une zone de restriction des mouvements des chevaux sur un rayon défini avec une mise en quarantaine des chevaux suspectés.
- La destruction des sources favorables au développement du vecteur sans des répercussions sur l'écologie.

Références Bibliographiques

- Abutarbush, S. M., O'Connor, B. P., Clark, C., Sampieri, F., Naylor, J. M., "Clinical West Nile virus infection in 2 horses in western Canada," *Can. Vet. J.*, V. 45, (2004), 315–317.
- **Agrawal, A.G., Petersen, L.R., "Human immunoglobulin as a treatment for West Nile virus infection", *J. Infect. Dis.*, V. 188, n° 1, (2003), 1-4.**
- Ahmadnejad, F., "West Nile Virus Circulation in Equine Population from Iran: Epidemiological Impact of Environment and Climate", Thèse de doctorat, Ecole de doctorale de Grenoble "Ingénierie pour la santé, la cognition et l'environnement", (2006), 135.

- Alerstam, T., "Bird migration", Cambridge: Cambridge University Press, (1990), 252 p.
- Anderson, J.F, Main, A.J., Andreadis, T.G., Wikel, S.K. et Vossbrick, C.R., "Transstadial transfer of West Nile virus by three species of Ixodid ticks (Acari : Ixodidae) ", *J. Med. Entomol.* V. 40, n° 4, (2003), 528-533.
- **Anderson, J.F., Rahal, J.J., "Efficacy of interferon alpha-2b and ribavirin against West Nile virus in vitro", *Emerg. Infect. Dis.*, V. 8, n° 1, (2002), 107–108.**
- **Anderson, J.F., Rahal, J.J., "Efficacy of interferon alpha-2b and ribavirin against West Nile virus in vitro", *Emerg. Infect. Dis.*, V. 8, n° 1, (2002), 107–108.**
- Arun, V., Iyer K., and Kousoulas G.A., "Review of Vaccine Approaches for West Nile Virus", *Int. J. Environ. Res. Public Health*, V10, (2013), 4220-4223.
- Bakonyi, T., Hubálek, Z., Rudolf, I., Nowotny, N., "Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe", *Emerg. Infect. Dis.*, V. 11, n° 2, (2005), 225–231.
- Bakonyi, T., Ivanics, E., Erdélyi, K., Ursu, K., Ferenczi, E., Weissenböck, H., Nowotny, N., "Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe", *Emerg. Infect. Dis.*, V. 12, n° 4, (2006), 618–623.
- Balakrishnan, A., Butte, D.K., Jadhav, S.M., "Complete genome sequence of west nile virus isolated from alappuzha district, kerala, India", *Genome Announc.*, V. 1, n° 3, (2013), 1–2.
- Baqar, S., H.C.G., Murphy, J.R., Watts, D.M., "Vertical transmission of West Nile virus by Culex and Aedes species mosquitoes", *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, V. 48, (1993), 757-762.
- Bargaoui, R., "Epidémiologie de la fièvre West Nile en Tunisie", Thèse de doctorat, Université Montpellier II, Sciences et techniques du Languedoc, Montpellier, France, (2012), 182 p.
- Barzon L, Papa A, Pacenti M, Franchin, E., Lavezzo, E., Squarzon, L., Masi, G., Martello, T., Testa, T., Cusinato, R., Palù, G., "Genome sequencing of West Nile Virus from human cases in Greece, 2012", *Viruses*, V. 5, n° 9, (2013), 2311–2319.
- Beasley, D. W., "Recent advances in the molecular biology of west nile virus," *Curr. Mol. Med.*, V. 5, (2005), 835-850.

- Beasley, D.W., Barrett, A.D., Tesh, R.B., “Resurgence of West Nile neurologic disease in the United States in 2012: what happened? What needs to be done? ”, *Antiviral Res.*, V. 99, n° 1, (2013), 1-5.
- Ben-Nathan, D., Gershoni-Yahalom, O., Samina, I., Khinich, Y., Nur, I., Laub, O., Gottreich, A., Simanov, M., Porgador, A., Rager-Zisman B., and Orr N., “Using high titer West Nile intravenous immunoglobulin from selected Israeli donors for treatment of West Nile virus infection”, *BMC Infect. Dis.*, V. 9, (2009), 18 p.
- Bernard, K.A., Maffei, J.G., Jones, S.A., Kauffman, E.B., Ebel, G., Dupuis, A.P., Ngo, K.A., Nicholas, D.C., Young, D.M., Shi, P.Y., Kulasekera, V.L., Eidson, M., White, D.J., Stone W.B., Kramer L.D., “West Nile virus infection in birds and mosquitoes, New York State”, *Emerg. Infect. Dis.*, V. 7, (2000), 679–685.
- Bernkopf, H., Levine, S., Nerson, R., “Isolation of West Nile virus in Israel”, *J. Infect. Dis.*, V. 93, (1953), 207–218.
- Biedenbender, R., Bevilacqua, J., Gregg, A.M., Watson, M., Dayan, G., “Phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter study to investigate the immunogenicity and safety of a West Nile virus vaccine in healthy adults”, *J. Infect. Dis.* 2011, 203, 75–84.
- Bin, H., Grossman, Z., Pokamunski, S., Malkinson, M., Weiss, L., Duvdevani, P., Banet, C., Weisman, Y., Annis, E., Gandaku, D., Yahalom, V., Hindyieh, M., Shulman L., Mendelson E., “West Nile fever in Israel 1999–2000: from geese to humans”, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* V. 951, (2001), 127–142.
- Blitvich, B.J., “Transmission dynamics and changing epidemiology of West Nile virus”, *Anim. Health. Res. Rev.*, V. 9, (2008), 71-86.
- Blitvich, B.J., Marlenee, N.L., Hall, R.A., Calisher, C.H., Bowen, R.A., Roehrig, J.T., Komar, N., Langevin, S.A., Beaty, B.J., “Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of serum antibodies to west nile virus in multiple avian species”, *J Clin Microbiol* V. 41, (2003), 1041-1047.
- Bogachek MV, Protopopova EV, Loktev VB, Zaitsev BN, Favre M, Sekatskii SK, Dietler G (2008). Immunochemical and single molecule force spectroscopy studies of specific interaction between the laminin binding protein and the West Nile virus surface glycoprotein E domain II. *J Mol Recognit* 21:55-62.
- Bogachek MV, Zaitsev BN, Sekatskii SK, Protopopova EV, Ternovoi VA, Ivanova AV, Kachko AV, Ivanisenko VA, Dietler G, Loktev VB (2010). Characterization of glycoprotein E C-end of West Nile virus

and evaluation of its interaction force with $\alpha V\beta 3$ integrin as putative cellular receptor. *Biochemistry (Mosc)* 75:472-480.

- Brault, A.C., "Changing patterns of West Nile virus transmission: altered vector competence and host susceptibility," *Vet. Res.*, V. 40, n° 43, (2009), 1 – 19.
- Bunning, M.L., Bowen, R.A., Cropp, C.B., Sullivan, K.G., Davis, B.S., Komar, N., Godsey, M.S., Baker, D., Hettler, D.L., Holmes, D.A., Biggerstaff, B.J., Mitchell, C.J., "Experimental infection of horses with West Nile virus", *Emerg. Infect. Dis.*, V. 8, (2002), 380-386.
- Calisteri, P., Giovannini, A., Hubalek, I., Ionescu, A., Monaco, F., Salivi, G., et Lelli, R., "Epidémiologie of west nile in Europe and the Mediterranean basin", *Open virol. J.*, V. 4, (2010), 29-37.
- Camenga, D.L., Nathanson, N., Cole, G.A., "Cyclophosphamide-potentiated West Nile viral encephalitis: relative influence of cellular and humoral factors", *J. Infect. Dis.*, V. 130, n° 6, (1974), 634–641.
- Cantile, C., Di Guardo, G., Eleni, C., Arispici, M., "Clinical and neuropathological features of West Nile virus equine encephalomyelitis in Italy," *Equine Vet. J.*, V. 32, (2000), 31-35.
- Cantile, C., Piero, F. D., di Guardo, G., Arispici, M., "Pathologic and immunohistochemical findings in naturally occurring West Nile virus infection in horses," *Vet. Pathol.*, V. 38, (2001), 414–421.
- Castillo-Olivares, J. K. L., Phipps, L. P., Johnson, N., Tearle, J., Fook, A. R., "Antibody reponse in horses following experimental infection with West Nile Virus lineages 1 and 2," *Transbound. Emerg. Dis.*, V. 58, n° 3, (2011), 206-212.
- Chancey, C., Grinev, A., Volkova, E., and Rios, M., "The global ecology end epidemiology of West Nile Virus", *BioMed. Research International*. V. 2015, (2015), 20 p.
- Chu J-J, Ng M-L. Interaction of West Nile virus with $\alpha V\beta 3$ integrin mediates virus entry into cells. *J. Biol. Chem.* 2004, **279**, 54533-54541.
- Clergeau, P., "Oiseaux à risques en ville et en campagne", Paris: INRA éditions; 2006, 376 p.
- Comstedt, P., Bergström, S., Olsen, B., Garpmo, U., Marjavaara, L., Mejlou, H., Barbour, A.G., Bunikis, J., "Migratory passerine birds as reservoirs of Lyme borreliosis in Europe", *Emerg. Infect. Dis.*, V.12, (2006), 1087-1095.

- Cunha, B. A., "Alexander the Great and West Nile Virus Encephalitis (Reply)," *Emerg. Infect. Dis.*, V.10, n° 7, 1328-1329.
- Dauphin, G., Zientara, S., "Recent trends in diagnosis and vaccine development," *Vaccine*, V. 25, (2007), 5563-5576.
- Dauphin, G., Zientara, S., Zeller, H., Murgue, B., "West Nile: Worldwide current situation in animals and humans", *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, V. 27, (2004), 343–355.
- Diamond, M. S., "West Nile Encephalitis Virus Infection : West Nile Encephalitis Virus Infection," *Emerging Infectious Diseases of the 21st Century*, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO, USA, (2009), 489 p.
- Diaz, L.A., Komar, N., Visintin, A., Julia Dantur Juri, M., Stein, M., Lobo Allende, R., Spinsanti, L., Konigheim, B., Aguilar, J., Laurito, M., Almirón, W., and Contigiani M., "West Nile virus in birds, Argentina", *Emerging Infectious Diseases*, V. 14, n° 4, (2008), 689 - 690.
- Durand, B., Dauphin, G., Labie, J., Zeller, H., Zientara, S., " Résultats d'une enquête sérologique sur l'infection à virus West Nile chez les équidés dans le Var, en 2003 ", *Environ. risques santé*, V. 4, n° 2, (2005) 114-118.
- El Harrack, M., Le Guenno, B., Gounon, P., "Isolement du Virus West Nile au Maroc ", *Virologie*, V. 1, (1997), 248-249.
- Epp, T., Waldner, C., West, K., Townsend, H., "Factors associated with West Nile virus disease fatalities in horses," *Can. Vet. J.*, V. 48, (2007), 1137–1145.
- Figuerola, T., Jiménez-Clavero, M.A., Lopez, G., Rubio, C., Soriguer, R., Gomez-Tejedor, C. et Tenorio, A., "Seize matters : West Nile Virus neutralizing antibodies in resident and migratory birds in Spain", *Vet. Microbiol.*, V. 132, (2008), 39-46.
- Figuerola, T., Jiménez-Clavero, M.A., Rojo, G., Gomez-Tejedor, C. et Soriguer, R., "Prevalence of West Nile virus neutralizing antibodies in colonial aquatic birds in southern Spain", *Avian. Pathol*, V. 36, n° 3, (2007), 209-212.
- Friend, M., Mclean, R.G., Dein, F.J., "Disease emergence in birds: challenges for the twenty-first century", *The Auk.*, V. 118, (2001), 290 – 303.

- Frost, M.J., Zhang, J., Edmonds, J.H., Frost, M.J., Zhang, J., Edmonds, J.H., Prow, N.A., Gu, X., Davis, R., Hornitzky, C., Arzey, K.E., Finlaison, D., Hick, P., Read, A., Hobson-Peters, J., May, F.J., Doggett, S.L., Haniotis, J., Russell, R.C., Hall, R.A., Khromykh, A.A. and Kirkland P.D., "Characterization of virulent West Nile virus Kunjin strain, Australia, 2011", *Emerg. Infect. Dis.*, V. 18, n° 5, (2012), 792–800.
- Galli, M., Bernini, F., Zehender, G., "Alexander the Great and West Nile Virus encephalitis", *Emerging Infect. Dis.*, V. 10, (2004), 1328–1333.
- Gangoso, L., Grande, J.M., Llorente, F., Jimenez-Clavero, M.A., Perez, J.M., Figuerola, J., "Prevalence of neutralizing antibodies to West Nile virus in Eleonora's Falcons in the Canary Islands", *J. Wildl. Dis.*, V. 46, (2010), 1321–1324.
- Garmendia, A. E., Van Kruiningen, H. J., French, R. A., "The West Nile virus: its recent emergence in North America", *Microbes Infect.*, V. 3, n°3, (2001), 223-229.
- Garmendia, A.E., Van Kruiningen, H.J., French, R.A., Anderson, J.F., Andreadis, T.G., Kumar, A., West, A.B., "Recovery and identification of West Nile virus from a hawk in winter", *J. Clin. Microbiol.*, V. 38, (2000), 3110-3111.
- Glaser, A. (2004). "West Nile virus and North America: an unfolding story." *Rev.sci.tech.Off.int.Epiz.* 23(2): 557-568.
- Gollins SW, Porterfield JS (1986).pH-dependent fusion between the flavivirus West Nile and liposomal model membranes. *J Gen Virol* 67:157-166.
- Gubler, D.J., et Roehrig, J.T., "Arboviruses (*Togaviridae* and *Flaviviridae*)", *Topley and Wilson's Microbiology and Microbiol Infections*, V. 1, (1998), 579 – 600.
- Haley, M., Retter, A.S., Fowler D., Gea-Banacloche, J., O'Grady, NP., "The role for intravenous immunoglobulin in the treatment of West Nile virus encephalitis", *Clin. Infect. Dis.*, V. 37, n° 6, (2003), 88–90.
- Hall, R.A., Broom, A.K., Smith, D.W., Mackenzie, J.S., "The ecology and epidemiology of Kunjin virus", *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, V. 267, (2002), 253-269.
- Hall, R.A., Scherret, J.H., Mackenzie, J.S., "Kunjin virus: an Australian variant of West Nile? ", *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, V. 951, (2001), 153-160.

- Hammouda, A., Lecollinet, S., Hamza, F., Nasri, I., Neb, A., Selmi, S., Exposure of resident sparrows to West Nile virus evidenced in South Tunisia. *Epidemiol. Infect.*, V. 143, n° 16, (2015), 3546 – 3549.
- Hannoun, C., Rau, U., “Experimental transmission of certain arboviruses by argas reflexus”, *Folia Parasitol.*, V.17, (1970), 365-366.
- Hayes, C. G., “West Nile fever. In: The Arboviruses: Epidemiology and Ecology”, Monath T. P. Ed., V. 5, (1989), 59-88.
- Hayes, E. B., Sejvar, J.J., Zaki, S. R., Lanciotti, R. S., Bode, A. V., Campbell, G. L., “Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease,” *Emerg. Infect. Dis.*, V. 11, (2005), 1174 – 1179.
- Higgs, S., Schneider, B.S., Vanlandingham, D.L., Klingler, K.A., Gould, E.A., “Nonviremic transmission of West Nile virus”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, V. 102, (2005), 8871-8874.
- Hubalek, Z., “An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds”, *J. Wild. I. Dis.*, V. 40, (2004), 639-659.
- Hubalek, Z., Halouzka, J., “West Nile fever—A reemerging mosquito-borne viral disease in Europe”, *Emerg. Infect. Dis.*, V. 5, (1999), 643–650.
- Hubálek, Z., Halouzka, J., Juricová, Z., Sebesta, O., “First isolation of mosquito-borne West Nile virus in the Czech Republic”, *Acta. Virol.*, V. 42, n° 2, (1998), 119–120.
- **Huggins, J.W., “Prospects for treatment of viral haemorrhagic fevers with ribavirin, a broad-spectrum antiviral drug”, *Rev. Infect. Dis.*, V. 11, (1989), 750–761.**
- Hyes, C.G., “West Nile virus : Uganda, 1937, to New York cite, 1999”, *Annals New York Academy of science*, (2001), 25 – 37.
- **Jackson. A.C., “Therapy of West Nile virus infection”, *Can. J. Neurol. Sci.*, V. 31, n° 2, (2004), 131–134.**
- Janovy, J., “Protozoa, helminths, and arthropods of birds. In: Clayton, DH and Moore, J, ed. *Hostparasite evolution: general principles and avian models*”. Oxford: Oxford University Press, (1997), 303-337.

- Johnson, A.L., "Update on infectious diseases affecting the equine nervous system", *Vet. Clin. North. Amer. Equine Pract.*, V. 27, (2011), 573–587.
- **Jordan, I., Briese, T., Fischer, N., Lau, J.Y., Lipkin, W.I., "Ribavirin inhibits West Nile virus replication and cytopathic effect in neural cells", *J. Infect. Dis.*, V. 182, (2000), 1214–17.**
- Joubert, L., Oudar, J., Hannoun, C., Beytout, D., Corniou, B., Guillon, J. C., Panthier, R., "Epidémiologie du virus West Nile: étude d'un foyer en Camargue. IV. La méningo-encéphalomyélite du cheval ", *Ann. Inst. Pasteur*, V. 118, n°2, (1970), 239–247.
- Jozan, M., Evans, R., McLean, R., Hall, R., Tangredi, B., Reed, L., Scott, J., "Detection of West Nile Virus infection in birds in the United States by blocking ELISA and immunohistochemistry", *Vector Borne Zoonotic. Dis.*, V. 3, (2003), 99–110.
- Knipe, D.M., Howley, P.M., "Fields virology", 5th ed., Wolters Kluwer and Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, USA, (2007), 1153–1252.
- Komar, N., Langevin, S., Hinten, S., Nemeth, N., Edwards, E., Hettler, D., Davis, B., Bowen, R., Bunning, M., "Experimental infection of north american birds with the New York 1999 strain of West Nile virus," *Emerg. Infect. Dis.*, V. 9, (2003), 311–322.
- **Konishi E, Mason PW (1993). Proper maturation of the Japanese encephalitis virus envelope glycoprotein requires cosynthesis with the premembrane protein. *J Virol* 67:1672-1675.**
- Kostjukov, MA., Gordeeva, Z.E., Bulychev, V.P., Nemova, N.V., Daniiarov, O.A., "The lake frog (*Rana ridibunda*) one of the food hosts of blood-sucking mosquitoes in Tadzhikistan a reservoir of the West Nile fever virus", *Med. Parazitol. (Mosk)*, V. 3, (1985), 49-50.
- **Kramer, A.H., "Viral encephalitis in the ICU", *Crit. Care. Clin.*, V. 29, n° 3, (2013), 621–649.**
- Kramer, L. D., Li, J., Shi, P.Y., "West Nile virus", *Lancet Neurol.*, V. 6, (2007), 171-181.
- Kulkarni, A. B., Mullbacher, A., Blanden, R. V., "In vitro T-cell proliferativeresponse to the flavivirus, West Nile," *Viral Immunol.*, V. 4, (1991), 73–82.

- Lanciotti, R.S., Ebel, G.D., Deubel, V., Kerst, A.J., Murri, S., Meyer, R., Bowen, M., McKinney, N., Morrill, W.E., Crabtree, M.B., Kramer, L.D., Roehrig, J.T., “Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East”, *Virology*, V. 298, (2002), 96-105.
- Lanciotti, R.S., Roehrig, J.T., Deubel, V., Smith, J., Parker, M., Steele, K., Crise, B., Volpe, K.E., Crabtree, M.B., Scherret, J.H., Hall, R.A., MacKenzie, J.S., Cropp, C.B., Panigrahy, B., Ostlund, E., Schmitt, B., Malkinson, M., Banet, C., Weissman, J., Komar, N., Savage, H.M., Stone, W., McNamara, T., Gubler, D.J., “Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States,” *Science*, V. 286, (1999), 2333-2337.
- **LAPRAS M., FLORIO R. et al. (1968) « Etude électro-clinique de la méningo-encéphalo-myélite du cheval à arbovirus équino-humain (west nile) isolé en Camargue : Le Journal de médecin de Lyon 49 (150) : 1423-41.**
- Lawrie, C.H., Uzcátegui, N.Y., Gould, E.A., et Nuttal, P.A., “Ixodid and argasid tick species and West Nile virus”, *Emerg. Infect. Dis.*, V. 10, n° 4, (2004), 635-637.
- Le Guenno, B., Bougermouh, A., Azzam, T., Bouakaz, R., “West Nile: a deadly virus ? ”, *Lancet*, V. 348, n° 9037, (1996), 1315.
- Lecollinet S, Les flaviviridae. Cours de virologie de l’Ecole Nationale Vétérinaire d’Alfort, 2013.
- Ledgerwood, J.E., Pierson, T.C., Hubka, S.A., Desai, N., Rucker, S., Gordon, I.J., Enama, M.E., Nelson, S., Nason, M., Gu, W., “A West Nile virus DNA vaccine utilizing a modified promoter induces neutralizing antibody in younger and older healthy adults in a phase I clinical trial”, *J. Infect. Dis.* V. 203, (2011), 1396–1404.
- Ledizet, M., Kar, K., Foellmer, H.G., Wang, T., Bushmich, S.L., Anderson, J.F., Fikrig, E., Koski, R.A., “A recombinant envelope protein vaccine against West Nile virus”, *Vaccine*, V. 23, (2005), 3915–3924.
- Lelli, R., Calistri, P., Bruno, P., Monaco, F., Savini, G., Di Sabatino, D., Corsi, I., and Pascucci, I., “West Nile Transmission in Resident Birds in Italy”, *Transboundary and Emerging Diseases*, (2011), 8 p.
- Levi, M.E., Quan, D., Ho, J.T., Kleinschmidt-Demasters, B.K., Tyler, K.L., Grazia, T.J., “Impact of rituximab-associated B-cell defects on West Nile virus meningoencephalitis in solid organ transplant recipients”, *Clin. Transplant.*, V. 24, n° 2, (2010), 223–228.

- Llopis, I.V., Rossi, L., Di Gennaro, A., Mosca, A., Teodori, L., Tomassone, L., Grego, E., Monaco, F., Lorusso, A., Savini G., "Further circulation of West Nile and Usutu viruses in wild birds in Italy", *Infection, Genetics and Evolution*, V. 32, (2015), 292 – 297.
- López, G., Jiménez-Clavero, M.Á., Vázquez, A., Soriguer, R., Gómez-Tejedor, C., Tenorio, A., Figuerola, J., "Incidence of West Nile virus in birds arriving in wildlife rehabilitation centers in southern Spain", *Vector Borne Zoonotic Dis.*, V. 11, n° 3, (2011), 285-90.
- Lvol, D.K., "Natural foci of arboviruses in the USSR", *Sou. Med. Virol.*, (1987), V. 1, (1987), 153-196.
- Mackenzie, T.S., Williams, D.T., "The zoonotic flaviviruses of southern, south-eastern and eastern Asia, and Australasia : the potential for emergent virus", *Zoonoses Public Health*, V 56, n°6, (2009), 338-356.
- Marr, J. S., Calisher, CH., "Alexander the Great and West Nile Virus encephalitis", *Centers for Disease Control and Prevention*, (2009)., http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/9/12/03-0288_article.htm., consulté le 19 février 2013.
- Martin, J.E., Pierson, T.C., Hubka, S., Rucker, S., Gordon, I.J., Enama, M.E., Andrews, C.A., Xu, Q., Davis, B.S., Nason, M., Fay, M.P., Koup, R.A., Roederer, M., Bailer, R.T., Gomez, P.L., Mascola, J.R., Chang, G-J.J., Nabel, G.J., and Graham, B.S., "A West Nile virus DNA vaccine induces neutralizing antibody in healthy adults during a phase 1 clinical trial", *J. Infect. Dis.*, V. 196, (2007), 1732–1740.
- Martín-Acebes, M.A., Saiz, J.C., "West Nile virus: A re-emerging pathogen revisited", *World J. Virol.*, V. 1, n° 2, (2012), 51-70.
- May, F.J., Davis, C.T., Tesh, R.B., Barrett, A.D., "Phylogeography of West Nile virus: from the cradle of evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas", *J. Virol.* V. 85, n° 6, (2011), 2964–2974.
- McIntosh, B. M., Jupp, P. G., Santos, D., Meenehan, G.M., "Epidemics of West Nile and Sindbis viruses in South Africa with *Culex (Culex) univittatus* Theobald as vector ", *S. Afr. J. Sci.*, V. 72, (1976), 295-300.
- MEDROUH B., et al., 2015.
- Metallaoui, A., "Rapport du projet GCP/RAB/002/FRA de renforcement de la surveillance et des systèmes d'alerte pour la fièvre catarrhale ovine, la fièvre du Nil occidentale et la rage au Maroc, Algérie et Tunisie", *F. A. O.*, (2008), 24 p.

- Miller, B.R., Nasci, R.S., Godsey, M.S., Savage, H.M., Lutwama, J.J., Lanciotti, R.S., Peters, C.J., “First field evidence for natural vertical transmission of West Nile virus in *Culex univittatus* complex mosquitoes from Rift Valley Province, Kenya”, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, V. 62, (2000), 240-246.
- Monath, T.P. “Yellow fever: An update”, *Lancet Infect. Dis.*, V. 1, (2001), 11–20.
- Morales, M. A., Barrandeguy, M., Fabbri, C., Garcia, J. B., Vissani, A., Trono, K., Gutierrez, G., Pigretti, S., Menchaca, H., Garrido, N., Taylor, N., Fernandez, F., Levis, S., Enria, D., “ West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006 ”, *Emerg. Infect. Dis.*, V. 12, (2006), 1559-1561.
- **Morrey, J.D., Siddharthan, V., Olsen, A.L., Roper, G.Y., Wang, H., Baldwin, T.J., Koenig, S., Johnson, S., Nordstrom, J.L., Diamond, M.S., “Humanized monoclonal antibody against West Nile virus envelope protein administered after neuronal infection protects against lethal encephalitis in hamsters”, *J. Infect. Dis.* V., 194, n° 9, (2006), 1300–1308.**
- Moutou F., “Les migrations aviaires et le transport des agents infectieux”, In Cohen G. Mathiot C. and Le Minor L. eds. *La veille microbiologique*, Paris: Elsevier; V.1, (2001), 77 – 90.
- **Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol* 3(1): 13-22.**
- Mumcuoglu, K.Y., Banet-Noach, C., Malkinson, M., Shalom, U., Galun, R., “Argasid ticks as possible vectors of West Nile virus in Israel”, *Vector Borne Zoonotic Dis.*, V. 5, (2005), 65-71.
- Murgue, B., Murri, S., Triki, H., Deubel, V., Zeller, H. G., “West Nile in the Mediterranean basin: 1950–2000”, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, V. 951, (2001), 117–126.
- National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID).2014.
- Nuttal P.A. Viruses, bacteria, and fungi of birds. In: Clayton D.H. and Moore J. eds. *Host-parasite evolution: general principles and avian models*. Oxford, Oxford University Press, (1997), 271-302.
- Office international des Epizooties (OIE), “Fièvre West nile”, *Manuel tresstre de l’OIE*, Chap. 2.1.20., (2008), 414 – 424.
- Oldach, D., Benitez, R. M., Mackowiak, P. A., “Alexander the Great and West Nile.

- Olsen, B., Munster, V.J., Wallensten, A., Waldenström, J., Osterhaus, A. D. M. E., Fouchier, R. A. M., “Global patterns of Influenza A virus in wild birds”, *Science*, V. 312, (2006), 384-388.
- Papa, A., Bakonyi, T., Xanthopoulou, K., Vázquez, A., Tenorio, A., Nowotny, N., “Genetic characterization of West Nile virus lineage 2, Greece, 2010”, *Emerg. Infect. Dis.*, V. 17, n° 5, (2011), 920–922.
- Pepperell, C., Rau, N., Krajden, S., Kern, R., Humar, A., Mederski, B., Simor, A., Low, D. E., Mc Geer, A., Mazzulli, T., Burton, J., Jaigobin, C., Fearon, M., Artsob, H., Drebot, M. A., Halliday, W., Brunton, J., “West Nile virus infection in 2002: morbidity and mortality among patients admitted to hospital in southcentral Ontario”, *Can. Med. Assoc. J.*, V. 168, n° 11, (2003), 1399-1405.
- Petersen L R, Roehrig J T. West Nile virus: a reemerging global pathogen. *Emerg Infect Dis.* 2001, **7**(4), 611-4.
- Petersen, L. R., Marfin, A. A., “West Nile virus: A primer for the clinician,” *Ann. Intern. Med.*, V. 137, (2002), 173–179.
- Peterson, A. T., Vieglais, D. A., Andreasen, J. K., “Migratory birds modeled as critical transport agents for West Nile Virus in North America,” *Vector Borne Zoonot. Dis.*, V. 3, (2003), 27–37.
- Platonov, A. E., Shipulin, G. A., Shipulina, O.Y., Tyutyunnik, E. N., Frolochkina, T. I., Lanciotti, R.S., Yazyshina, S., Platonova, O.V., Obukhov, I.L., Zhukov, A.N., Vengerov, Y.Y., and Pokrovskii. V.I., “Outbreak of West Nile virus infection. Volgograd Region, Russia 1999”, *Emerg. Infect. Dis.*, V. 7, n° 1, (2001), 128–132.
- **Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N (1989). Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J* 8: 3867-3874.**
- Randolph, S.E., et Rogers, D.J., “The arrival establishment and spread of exotic diseases : Patterns and predactions”, *Nat. Rev. Microbiol.*, V. 8, (2010), 361-371.
- Repik, P.M., “West Nile virus. In *The Jordan Report: Accelerated Development of Vaccines 2012*”, National Institute of Health: Bethesda, MD, USA, (2012), 106–108.

- **Rice CM, Aebersold R, Teplow DB, Pata J, Bell JR, Vorndam AV, Trent DW, Brandriss MW, Schlesinger JJ, Strauss JH (1986). Partial N-terminal amino acid sequences of three nonstructural proteins of two flaviviruses. *Virology* 151:1-9.**
- Sabatino, D.D., Bruno, R., Sauro, F., Danzetta, M.L., Cito, F., Iannetti, S., Narcisi, V., De Massis, F., and Calistri P., "Epidemiology of West Nile Disease in Europe and in the Mediterranean Basin from 2009 to 2013", *BioMed. Research International.*, V. 2014, (2014), 10 p.
- Samuel C E. Host genetic variability and West Nile virus susceptibility. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002, **99**(18), 11555–11557.
- Sayao, A.L., Suchowersky, O., Al-Khathaami, A., Klassen, B., Katz, N.R., Sevick, R., Tilley, P., Fox, J., Patry, D., "Calgary experience with West Nile virus neurological syndrome during the late summer of 2003", *Can. J. Neurol. Sci.*, V. 31, (2004), 194-203.
- Schuffenecker, I., Peyrefitte, C. N., El Harrak, M., Murri, S., Leblond, A., and Zeller, H., "West Nile virus in Morocco, 2003", *Emerg. Infect. Dis.* V. 11, (2005), 306–309.
- Sibru, A., Ceianu, C., Panculesar-Gatej, R., Vezquaz, A., Tenurio, A., Niedrig, M., Nicolescu, G., et Pistol, A., "Outbreak of west nile virus infection in humans, Romania, July to Octobre 2010", *Euro. Surveill.*, V. 16, n° 2, (2011), 19762 p.
- Smithburn KC, Hughes TP, Burke AW, Paul JH. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am. J. Trop. Medicine* 1940;20:471–492.
- Steele K E, Linn M J, Schoepp R J *et al.* Pathology of fatal West Nile virus infections in native and exotic birds during the 1999 outbreak in New York City, New York. *Vet. Pathol.* 2000, **37**(3), 208-224.
- Steinman, A., Banet, C., Sutton, G. A., Yadin, H., Hadar, S., Brill, A., "Clinical signs of West Nile virus encephalomyelitis in horses during the outbreak in Israel in 2000," *Vet. Rec.*, V. 151, (2002), 47–49.
- Steinman, A., Banet-Noach, C., Simanov, L., Grinfeld, N., Aizenberg, Z., Levi, O., Lahav, D., Malkinson, M., Perk, S., Shpigel, N.Y., "Experimental infection of common garter snakes (*Thamnophis sirtalis*) with West Nile virus", *Vector Borne Zoonotic Dis.*, V. 6, (2006), 361-368.
- Styer, L.M., Kent, K.A., Albright, R.G., Bennett, C.J., Kramer, L.D., Bernard, K.A., "Mosquitoes inoculate high doses of West Nile virus as they probe and feed on live hosts", *PLoS Pathog.*, V. 3, (2007), 1262-1270.

- Swayne, D.E., Beck, J.R., Smith, C.S., Sheih, W.J., Zaki, S.R., "Fatal encephalitis and myocarditis in young domestic geese (*Anser anser domesticus*) caused by West Nile virus", *Emerg. Infect. Dis.*, V. 7, (2001), 551-553.
- Tardei, G., Ruta, S., Chitu, V., Rossi, C., Tsai, T. F., Cernescu, C., "Evaluation of immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme immunoassays in serologic diagnosis of West Nile virus infection," *J. Clin. Microbiol.*, V. 38, (2000), 2232–2239.
- Timothy, J.G., Cameron, E., Webb., "A review of the Epidemiological And Clinical aspects Of West Nile Virus", *International Journal Of General Medecine*, V. 7, (2014), 197-198.
- Triki, H., Murri, S., Le Guenno, B., Bahri, O., Hili, K., Sidhom, M., et Dellagi, K., "Méningo-encéphalite à arbovirus West Nile en Tunisie", *Med. Trop.*, V. 61, n° 6, (2001), 487-90.
- Tsai, T.F., Popovici, F., Cernescu, C., Campbell, G. L., Nedelcu, N. I., "West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania", *Lancet*, V. 352, (1998), 767–771.
- **Tunkel, A.R., Glaser, C.A., Bloch, K.C., Sejvar, J.J., Marra, C.M., Roos, K.L., Hartman, B.J. Kaplan, S.L., Scheld, W.M., and Whitley, R.J., "Infectious Diseases Society of America. The management of encephalitis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America", *Clin. Infect. Dis.*, V. 47, n°3, (2008), 303–327.**
- Turell, M.J., Sardelis, M.R., Dohm, D.J., O'Guinn, M.L., "Potential North American vectors of West Nile virus", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, V. 951, (2001), 317-324.
- Valiakos G, Athanasiou L V, Touloudi A, Papatsiros V, Spyrou V, Petrovska L, Billinis C. West Nile Virus: Basic Principles, Replication Mechanism, Immune Response and Important Genetic Determinants of Virulence. *In* Dr. German Rosas-Acosta (Editor). *Viral Replication*. InTech, 2013, 144 pages.
- Vazquez, A., Sanchez-Seco, M.P., Ruiz, S., "Putative new lineage of West Nile virus, Spain", *Emerg. Infect. Dis.*, V. 16, n° 3, (2010), 549–552.
- Venter, M., Human, S., Zaayman, D., Gerdes, G. H., Williams, J., Steyl, J., Leman, P. A., Paweska, J. T., Setzkorn, H., Rous, G., Murray, S., Parker, R., Donnellan, C., Swanepoel, R., "Lineage 2 West Nile virus as cause of fatal neurologic disease in horses, South Africa," *Emerg. Infect. Dis.*, V. 15, n° 6, (2009), 877–884.

- Vermeil, C., Lavillaureix, J., Beeb, E., "Sur la conservation et la transmission du virus West Nile par les arthropodes", *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, V. 53, n° 2, (1960), 273-279.
- Vikolay, B., Diallo, M., Boye, C.S.B., Sall, A.A., "Usutu virus in Africa", *Vector Borne Zoonotic Dis.* V 11, n° 11, (2011), 1417-1423.
- Walendström, J., Broman, T., Carlsson, I., Hasselquist, D., Achterberg, R.P., Wagenaar, J.A., Olsen, B., "Prevalence of *Campylobacter lari* and *Campylobacter coli* in different ecological guilds and taxa of migrating birds," *Appl. Environ. Microbiol.*, V. 68, (2002), 5911-5917.
- Weinberger, M., Pitlik, S. D., Gandacu, D., Lang, R., Nassar, F., Ben David, D., Rubinstein, E., Izthaki, A., Mishal, J., Kitzes, R., Siegman-Igra, Y., Giladi, M., Pick, N., Mendelson, E., Bin, H., Shohat, T., "West Nile fever outbreak, Israel, 2000: epidemiologic aspects", *Emerg. Infect. Dis.* V. 7, n° 4, (2001), 686-691.
- Wobeser, G., "Investigation and management of disease in wild animals", Ed. Plenum Press, New York, (1994), 265 p.
- Work, T.H., Hurlbut, H.S., Taylor R.M., "Indigenous wild birds of the Nile Delta as potential West Nile virus circulating reservoirs", *Am J Trop Med Hyg.* V.4, n° 5, (1955), 872-88.
- World Animal Health Information Database. WAHID 2010: Event summary. Available at <http://www.oie.int/wahis2/public/wahid.php/Reviewreport/semestrial/review?year=2010andsemester=0andwild=0andcountry=MARandthiscountrycode=MARanddetailed=1> (Accessed December 04, 2013).
- Younes-Bouacida N.S., "Contribution à une enquête de séroprévalence de la fièvre du nile de l'ouest chez les chevaux dans la region d'Alger, Boumerdès et Blida", thèse de magister, Spécialité Sciences Vétérinaires, Option : Microbiologie Médicale et Vétérinaire ENSV D'Alger (2013), 85 p.
- Zeller, H., Schuffenecker, I., "West Nile virus : An overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas", *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, V. 23, n°3, (2004), 147-156.
- Zeller, H., Zientara, S., Hars, J., Languille, J., Mailles, A., Tolou, H., Paty, M. C, Schaffner, F., Armengaud, A., Gaillan, P., Legras, J. F., Hendrikx, P., "West Nile outbreak in horses in Southern France: September 2004", *Euro. Surveill.* V. 9, n°4, (2004). 50-51.

- Zientara S, Dufour B, Moutou F, Guitteny B. Le point sur l'épizootie française de West Nile en 2000. *Bulletin épidémiologique de l'Afssa*. 2001, n°1, 1-2.
- Zientara, S., Lecollinet, S., "Le virus West Nile, sa diffusion limitée en Europe par comparaison avec sa rapide implantation en Amérique du Nord", *Rapports de l'Académie Nationale de Médecine*, Edition Lavoisier. Chapitre 13, (2010), 179-193.