



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 : Étude éco-épidémiologique dans les
régions Tizi-Ouzou et Bouira.**

Présenté par
TIGRINE Faredj
MESSAOUDENE Samir

Devant le jury :

Président :	TAHRIKT S.	M.A.B	ISV Blida 1
Examineur :	SADI M.	M.A.B	ISV Blida 1
Promoteur :	MEDROUH B.	M.A.B	ISV Blida 1

Blida : 2016/2017

RESUME

Le virus West Nile est un arbovirus appartenant à la famille des *Flaviviridae*, au genre *Flavivirus* et au sérocomplexe de l'encéphalite japonaise. Transmis par des moustiques ornithophiles principalement de genre *Culex*, les oiseaux jouent le rôle de l'amplificateur dans le cycle. L'homme et le cheval sont des hôtes accidentels constituant un cul de sac épidémiologique, chez ces derniers, le virus entraîne un simple syndrome fébrile, avec parfois un syndrome nerveux grave.

L'objectif de cette enquête est de détecter les anticorps anti VWN en Kabylie. 37 sérums ont été prélevés chez les pigeons dans deux régions à savoir Tizi-Ouzou et Bouira. Les prélèvements ont été analysés par la technique ELISA de type compétition. 4 échantillons ont fourni un résultat positif, soit une prévalence de 10,81% (4/37 échantillons), avec des taux de séropositivité de 18,75% et de 4,67% à Tizi-Ouzou et à Bouira respectivement. Aucune association statistiquement significative n'est observée pour ce facteur et la séroprévalence.

Mots clés : Virus West Nile, Kabylie, pigeons, ELISA, prévalence.

ABSTRACT

The West Nile virus is an arbovirus belongs to the family of *Flaviviridae*, to the genus *Flavivirus* and to the Japanese encephalitis sero-complement. Transmitted by ornithophilic mosquitoes mainly of the genus *Culex*, The birds play the role of the amplifier in the cycle. Man and Horse are accidental hosts constituting an epidemiological dead end, among them; the virus causes a simple febrile syndrome, with sometimes severe nervous syndrome.

The objective of this survey is to detect anti - WNV antibodies in kabylie. 37 serums were collected from mugs in two regions namely Tizi-Ouzou and Bouira. The swabs were analyzed by the ELISA technique of competition type. 4 patterns provided a positive result, whether a prevalence of 10,81% (4/37 patterns), with seropositivity rates of 18,75% and 4,67% at Tizi-Ouzou and at Bouira respectively. No statistically significant association is observed for this factor and seroprevalence.

Keywords: West Nile Virus, Kabylie, mugs, ELISA, prevalence.

ملخص

فيروس غرب النيل هو الفيروس المنقول بالمفصليات ينتمي لعائلة الفيروسات المصفرة (*Flaviviridae*) من النوع (*Flavivirus*) ولمصلية التهاب الدماغ الياباني من النوع (*Culex*)، الطيور تلعب دور المضيف المستودع (*Amplificateur*) في الحلقة. الإنسان و الحصان مضيفين عرضيين يسبب لهما الفيروس إصابات بدون أعراض، لكن في بعض الأحيان يمكن أن يحدث لديهما اضطراب عصبي مميت.

الهدف من هذه الدراسة هو الكشف عن الأجسام المضادة ضد - فيروس غرب النيل في منطقة القبائل. تم جمع 37 مصل من الحمام في منطقتي تيزي وزو والبويرة. العينات المحللة بواسطة تقنية ELISA من نوع منافسة. 4 عينات قدمت لنا نتيجة إيجابية، بانتشار مصلي يعادل 10,81% (37/4)، مع معدلات إيجابية المصل المقدرة بـ 18,75% و 4,67% في تيزي وزو والبويرة على التوالي. وقد لوحظ عدم وجود علاقة ذات دلالة إحصائية لهذا العامل ولانتشار المصلي.

كلمات البحث: فيروس غرب النيل، القبائل، الحمام، ELISA، انتشار.

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.

*Nous exprimons notre profonde gratitude à notre promoteur Mr. **Medrouh Bachir** maître assistant à l'université de Blida 1, de nous avoir encadrés avec sa cordialité franche et coutumière, Nous le remercions pour sa patience et sa gentillesse, pour ces conseils et ces orientations clairvoyantes qui nous a guidé dans la réalisation de ce travail.*

Chaleureux remerciement.

Nous tenons à remercier :

*Mr **TAHRIKT S.** De nous avoir fait l'honneur de présider notre travail.*

*Mr **SADI M.** D'avoir accepté d'évalué et d'examiné notre projet.*

Nous saisissons cette occasion pour exprimer notre 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.

DEDICACE

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 Dieu, le Très Haut, t'accorde santé, bonheur et longue vie ma Mère, et que dieu t'accueille dans son vaste paradis mon père, faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

À MES CHERS ET ADORABLE FRÈRES ET SŒURS

Lila, la prunelle de mes yeux, et son maré l'aimable Ali, Souad et Mounira, les douces, au cœur si grand, le généreux, Adel mon petit frère que j'adore, et mon frère et ami, Nadjib que j'aime profondément.

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

À MON GRAND AMOUR Nacira

Quand je t'ai connu, j'ai trouvé la femme de ma vie, mon ange, et la lumière de mon chemin. Ma vie à tes côtés est remplie de belles surprises. Tes sacrifices, ton soutien moral et matériel, ta gentillesse sans égal, ton profond attachement m'ont permis de réussir mes études.

À MES AMIS DE TOUJOURS :

Samir, Mohamed, Kouceila, Yacine, Belkacem, Mohand, Slimane, Nordine, Bouaziz, Yazid, Ghali Zidane ... En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble.

À TOUTE LA FAMILLE Tigrine et Bouaraba

Mr : TIGRINE Faredj

DEDICACE

*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 Dieu, le Très Haut, vous accordez santé, bonheur et longue vie, faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

À MES CHERS ET ADORABLE FRÈRES ET SŒURS

Imane, la prunelle de mes yeux, et la généreux, Amrane mon petit frère que j'adore et que j'aime profondément.

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

À MES AMIS DE TOUJOURS :

Faredj, Mohamed, Kouceila, Yacine, Belkacem, Mohand, Hamid, Nordine, Salem, Boukhalfa... En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments Agréables que nous avons passés ensemble.

À TOUTE LA FAMILLE Messaoudene et Cheballah

Mr: MESSAOUDENE Samir

TABLE DES MATIERES

RESUME.....	
REMERCIEMENT.....	
TABLE DES MATIERES.....	
LISTES DES ABREVIATIONS.....	
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX.....	
Introduction.....	15
1. Chapitre I : Généralité sur le virus West Nile.....	18
1.1. Historique :.....	19
1.2. Classification :.....	21
1.3. Cycle de multiplication viral:.....	23
1.4. Symptomatologique:.....	25
1.4.1. Chez l'homme:.....	25
1.4.2. Chez les équidés:.....	25
1.4.3. Chez les oiseaux:.....	26
1.5. Traitement et prophylaxie :.....	27
1.5.1. Traitement :.....	27
1.5.1.1. Chez l'homme :.....	27
1.5.1.2. Chez le cheval :.....	28
1.5.2. La vaccination :.....	29
1.5.2.1. Les vaccins humains :.....	29
1.5.2.2. L'immunité passive :.....	31
1.5.2.3. La vaccination chez les animaux :.....	31
2. Chapitre II : Epidémiologie du virus West Nile.....	33

2.1.	La répartition géographique :.....	34
2.2.	Lignages et souches :	35
2.2.1.	Phylogéographie :.....	35
2.3.	Cycle de transmission :.....	38
2.4.	La situation de la maladie en Algérie :.....	42
2.4.1.	Donnés historiques sur la maladie :.....	42
2.4.1.1.	Isolement de virus :.....	42
2.4.1.2.	Enquêtes sérologiques sur la fièvre du nil occidental :	43
3.	Chapitre III : Etude expérimentale	45
3.1.	Matériel et méthodes :.....	46
3.1.1.	Protocole de l'enquête :.....	46
3.1.1.1.	Problématique et objectif :.....	46
3.1.1.2.	Localisation géographique de la zone d'étude:.....	47
3.1.1.3.	Population d'étude :	49
3.1.1.3.1.	Oiseaux sédentaire :.....	49
3.1.1.4.	Capture des oiseaux et Période d'étude :.....	50
3.1.1.5.	Définition de cas :	51
3.1.1.6.	L'échantillonnage :.....	51
3.1.1.7.	Traitement des prélèvements:.....	52
3.1.1.7.1.	Méthode de prélèvement :.....	52
3.1.1.8.	Analyse des échantillons :.....	52
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 :.....	54
3.1.1.8.1.4.	Appareillage et matériel :.....	54

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 :	55
3.1.1.8.1.5.3. PRECAUTION :	55
3.1.1.8.1.5.4. PREPARATION DE LA SOLUTION DE LAVAGE :	55
3.1.1.8.1.6. Préparation des échantillons :.....	56
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
3.1.1.8.1.8.1. 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
3.2.2. Résultats sérologique :	61
3.2.2.1. Résultats d'ELISA par compétition :	61
3.2.2.1.1. Séroprévalence globale :	61
3.2.2.1.2. Séroprévalence en fonction de site de capture :	62
3.3. Discussion :	63
3.3.1. Echantillonnage :	63
3.3.2. Population d'étude :	63
3.3.3. Technique de laboratoire (ELISA par compétition) :	64

3.3.4. Etude de séroprévalence :.....	64
CONCLUSION :	
RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES.....	
REFERENCES	

LISTE DES ABREVIATIONS

- °C : degrés Celsius.
- AC : anticorps.
- AG : antigène.
- ARN : Acide Ribo Nucléique.
- BF : bruit de fond.
- CV : coefficient de variation.
- CX : Culex.
- DO : densité optique.
- DOCN : Densité optique de control négatifs.
- DOCP : Densité optique de control positifs.
- IgG : Immunoglobuline G.
- IgM : Immunoglobuline M.
- M : membrane.
- Min : minute.
- ml : millilitre.
- 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.
- VWN: Virus West Nile.
- WN : West Nile.
- WNV: West Nile Virus.
- CDC : The Centers for Disease Control and Prevention.
- USA: United States of America.

- PHAC: Public Health Agency of Canada.
- ECDC: European Center for Disease Control and Prevention.
- ARNm: Acide Ribo Nucléique messenger.
- ADN : Acide disoxyribo Nucléique.
- NIAID : National Institut of Allergy and Infectious Diseases.
- IV: Intra Veineux.
- ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay.
- ST: Sérum témoin.
- CVCN: coefficient de variation de control négatifs.
- IF : Immunofluorescence.

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

A. LISTE DES FIGURES

- Figure 1.1 : Structure de la polyprotéine virale et sites d'action des protéases.....	22
- Figure 1.2 : Schéma structurel du Virus West Nile.....	23
- Figure 1.3 : Cycle de multiplication des Flavivirus.....	24
- Figure 2.1 : Distribution globale du Virus West Nile dans le monde	35
- Figure 2.2 : Les lignages majeur du VWN.....	37
- Figure 2.3 : Distribution géographique des différents lignages du VWN.....	38
- Figure 2.4 : Représentation schématique de cycle de transmission du VWN.....	42
- Figure 3 .1 : La région d'étude Takerbouzt.....	48
- Figure 3.2 : La région d'étude Mahbane	48
- Figure 3.3 : Le pigeon biset domestique « <i>Columba livia</i> ».....	49
- Figure 3.4 : Filet japonais pour les oiseaux.....	50
- Figure 3.5 : Pigeon dans une charpente de maison.....	51
- Figure 3.6 : Bilan de capture selon la région.....	60
- Figure 3.7 : Séroprévalence globale par la technique ELISA.....	61
- Figure 3.8 : Résultats en fonction de site de capture.....	62

B. LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1.1 : Classification des Flaviviridae.....	21
- Tableau 1.2 : Symptomatologie lors d'incubation expérimentale de Virus West Nile chez le cheval.....	26
- Tableau 1.3 : Les vaccins contre le VWN en cours de développement clinique.....	30
- Tableau 1.4 : Les vaccins commercialisées et les vaccins en stade clinique.....	32
- Tableau 2.1 : Récapitulatif des enquêtes sérologiques menées en Algérie.....	44
- Tableau 2.2 : Enquête sérologique West Nile.....	44
- Tableau 3.1 : Distribution des oiseaux selon la région de capture.....	60
- Tableau 3.2 : Résultats globale de la sérologie par la technique ELISA.....	61
- Tableau 3.3 : Séropositivité en fonction de site de capture.....	63

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Isolé pour la première fois en Ouganda en 1937, le virus West Nile (VWN) est un arbovirus appartenant à la famille des *Flaviviridae* genre *Flavivirus* (**Kramer et al., 2007**). L'arbovirose la plus répandue au monde, largement signalée en Afrique, le sud de l'Europe, la Russie, le moyen orient, l'Inde et l'Australie, et depuis 1999 dans le nord de l'Amérique (**Garmendia, 2001 ; Murgue et al., 2001**). Son cycle naturel fait intervenir les oiseaux qui constituent le réservoir et les moustiques ornithophiles, essentiellement de genre *Culex*, en tant que vecteur. La contamination de l'homme et le cheval se fait de façon accidentelle.

Les oiseaux sont des porteurs de nombreux microorganismes dont certains sont des pathogènes potentiellement transmissibles à l'homme (zoonoses) ou aux animaux domestiques (**Janovy, 1997 ; Clergeau, 2006 ; Nuttal, 1997 ; Friend, 2001**). Les oiseaux ont de plus la particularité de pouvoir se déplacer rapidement sur des grandes distances. En quelques semaines, des milliards d'oiseaux transitent chaque année d'un continent à un autre pour rejoindre, selon la saison, leur site d'hivernage ou de nidification (**Alerstam et al., 1990**). Au cours de ces déplacements, ils véhiculent avec eux tout un panel de pathogènes susceptibles de conduire à l'émergence de maladie dans des zones jusqu'alors indemnes (**Moutou, 2001 ; Walendström, 2002 ; Hubalek, 2004 ; Comstedt, 2006 ; Olsen, 2006**).

Jusqu'à la fin des années 80, les épidémies à VWN étaient sporadiques, surviennent dans quelques pays d'Afriques et les formes neurologiques étaient exceptionnelles (**Karmer, 2007**). Depuis les années 1990, la maladie a changé de statut, des épidémies à VWN plus graves par la fréquence des formes neurologiques sont survenues en Algérie 1994, en Roumanie 1996, en Russie et aux Etats-Unis d'Amérique (USA) en 1999 (**Murgue et al., 2001 ; Tsai et al., 1998 ; Platonov et al., 2001, Karmer et al., 2007**), donc le VWN est devenu un grand problème de santé à la fois publique et vétérinaire en Europe et dans le bassin méditerranéen et ensuite les Etats-Unis d'Amérique.

En Algérie, le virus a été isolé pour la première fois en 1968 à l'institut pasteur d'Alger, à partir d'un broyat de vecteurs constituée d'un pool de 215 moustiques de genre *Culex* prélevé 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. Depuis, toutes les tentatives d'isolement du virus n'ont pas abouti, que se soit à partir des êtres

humains où à partir des animaux. En revanche, plusieurs enquêtes menées chez l'homme et chez les animaux ont révélé des cas positifs (**Metallaoui, 2008**).

Cependant, dans notre pays, les derniers résultats officiels remontent aux 1994, enquête prévue dans le cadre du projet GCP/RAB/002, ce qui met un point d'interrogation sur la situation actuelle de la maladie dans notre pays, ajoutant à ça l'absence de système de surveillance spécifique à cette maladie, contrairement à nos voisins la Tunisie et le Maroc.

CHAPITRE I :
GENERALITE SUR LE VIRUS WEST NILE

CHAPITRE I

GENERALITE SUR LE VIRUS WEST NILE

1.1. Historique :

En 1937, Le virus West Nile (VWN) ou virus du Nil occidental a été isolé pour la première fois en Ouganda chez une femme souffrant d'une forte fièvre (**Smithburn et al, 1940**) venant du West Nile district d'où son nom (**Smithburn et al, 1940**). Treize ans après sa découverte, le virus West Nile est isolé chez l'homme en Égypte, Aujourd'hui l'arbovirose est présente sur tous les continents à l'exception de l'Antarctique faisant de lui le virus le plus répandu au monde (**Murgue, 2002**).

En se basant sur des analyses phylogénétiques, le virus West Nile a émergé comme un virus distinct il y a 1000 ans (**Galli, 2004**). En 2009, le CDC (the Centers for Disease Control and Prevention) a rapporté que le virus West Nile peut être une des causes possible de la mort d'Alexandre le grand qui est décédé après 10 jours de fièvre (**Marr, 2009**). Certains auteurs ont cru reconnaître dans ces lignes et dans les symptômes d'Alexandre le grand, la première description de l'activité du virus West Nile 323 avant J.C. près de l'actuelle Bagdad (**Cunha, 2004 ; Oldach et al, 2004**).

La première épidémie due au VWN a été rapportée en Israël (1951-1952) (**Bernkopf, 1953**) où les premières manifestations neurologiques sévères ont été rapportées en 1957 et en 1962 (**Hayes, 1989**). Le virus a également sévi en France au courant de l'année 1962 (**Joubert, 1970**) et en Afrique du Sud (1974, 1984-1986) (**McIntosh, 1976 ; Jupp, 1986**).

À partir de 1994, le VWN regagne de l'activité dans l'ancien monde et des premiers cas humains ont été rapportés en Algérie (**Le Guenzo, 1996**). L'arbovirus révèle une pathogénicité plus importante et est à l'origine de plusieurs épisodes épidémiques observés chez l'homme et/ou les chevaux. En 1996, une épidémie éclate à Bucarest (Roumanie) avec plus de 500 cas d'encéphalite dont 17 mortelles (**Tsai, 1998**). En 1999, 40 décès sont rapportés dans les villes de Voljski et Volgograd, en Russie (**Platonov, 2001**) et en 2000, 8 décès ont été rapportés en Israël (**Weinberger, 2001**). Une situation différente est observée au Maroc (1996), en Italie et en France (2000, 2003, 2004 et 2006) où le virus a touché essentiellement les chevaux (**Murgue, 2001 ; El Harrack, 1997 ; Cantile, 2000 ; Zeller, 2004 ; Durand, 2005**).

En 1999 un tournant majeur est atteint, lorsqu'une épidémie éclate à New York, sur un territoire vierge de VWN, 62 cas d'encéphalite humaine (7 décès), 20 cas équins (9 décès). 10 ans plus tard le virus est considéré comme endémique sur tout le territoire nord-américain. Près de 12000 cas humains de méningites ou d'encéphalites dont plus de 1000 infections fatales y ont été répertoriés. Une mortalité massive de la faune aviaire locale y a aussi été observée **(Murray et al, 2010)**.

Cependant, l'épidémie va élargir son aire de distribution en atteignant l'ensemble des États-Unis ainsi qu'une grande partie du continent américain, du Canada **(Pepperell et al, 2003)** jusqu'en Argentine **(Morales et al, 2006)**. En 2011, plus de 712 et 110 cas ont été déclarés respectivement aux USA et Canada **(CDC, 2011; PHAC, 2011)** ainsi que 303 cas ont été recensés entre l'Europe et les pays voisins **(ECDC, 2011)**.

1.2. Classification :

Le virus west nile (VWN) appartient à la famille des *Flaviviridae*, genre *Flavivirus* (Gubler, 1998). Ce genre regroupe plus de 70 virus, avec approximativement 40 virus pathogènes pour l'homme (virus de la dengue, virus de l'encéphalite à tique, virus de l'encéphalite japonaise, virus de la fièvre jaune, etc.) (Knipe, 2007). Le genre est subdivisé en 12 complexes taxonomiques.

Le virus West Nile est un virus à ARN positif, enveloppé de 45 à 50 nm de diamètre. Il appartient à la famille des *Flaviviridae* et au genre *Flavivirus* comme d'autres virus humains, par exemple, ceux de la dengue et de la fièvre jaune (tableau1.1).

Plus particulièrement, il fait partie de sérocomplexe des encéphalites japonaises avec les virus de l'encéphalite de la Murray Valley et de Saint Louis, les virus Kunjin, Usutu, Koutango, Cacipacore, Alfuy et Yaounde. Tous les virus de ce complexe taxonomique sont des arbovirus (arthropod-borne virus) essentiellement transmis par des moustiques et affectant naturellement les oiseaux que l'on retrouve en Asie (encéphalite japonaise), Afrique (virus Usutu, Yaounde), en Amérique (encéphalite de Saint Louis), en Australie (encéphalite de la Murray Valley, virus Kunjin) et en Europe (virus Usutu).

Tableau 1.1: classification des Flaviviridae (d'après Lecollinet, 2013).

Genre	Virus	Espèces sensibles	Transmission
Flavivirus	Encéphalite Japonaise	Hommes, Chevaux, Porcs	Arboviroses
	West Nile	Hommes, Chevaux, Oiseaux	
	Dengue	Hommes	
	Fièvre Jaune	Hommes	
	Encéphalite à tiques d'Europe Centrale	Hommes	
	Louping ill	Ovins	
Pestivirus	Maladie des muqueuses	Bovins	Non arboviroses
	Border disease	Ovins	
	Peste Porcine Classique	Porcs	
Hepacivirus	Hépatite C	Hommes	
	Hépacivirus canin	Chiens	

Comme le montre la **(figure 1.1)** ci dessous, le génome du virus West Nile code pour une polyprotéine qui est clivée par des protéases en trois protéines structurales et sept non structurales. Les protéines structurales sont:

- la protéine C (nucléocapside icosaédrique composée de multiples protéines C).
- la protéine M (bloque la fusion virale).
- la protéine E (tropisme, attachement viral, hémagglutination, fusion de la membrane, assemblage).

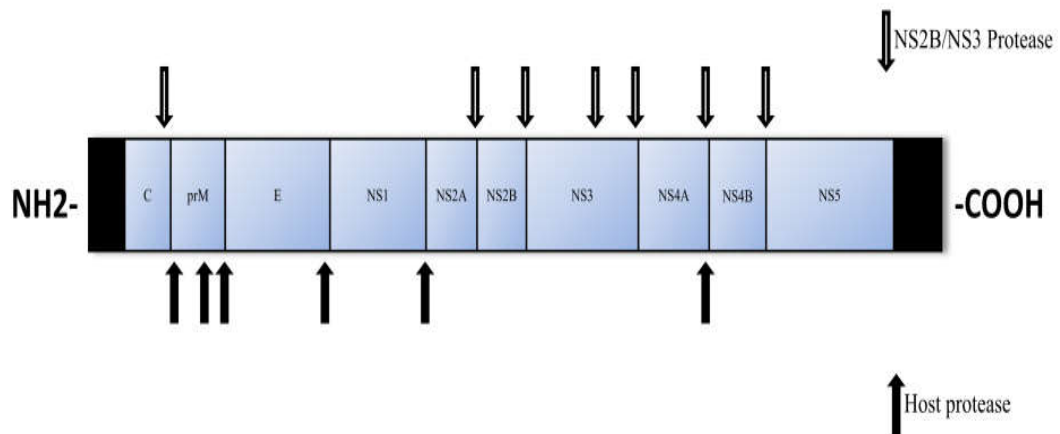


Figure 1.1: structure de la polyprotéine virale et sites d'action des protéases
(d'après Valiakos et al, 2013).

Les protéines E et M constituent l'enveloppe du virus avec la membrane de la cellule hôte comme on peut le voir sur la **(figure 1.2)** qui présente la structure du virus West Nile.

Les protéines non structurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5, régulent la transcription virale, assurent la réplication et participent à l'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte.

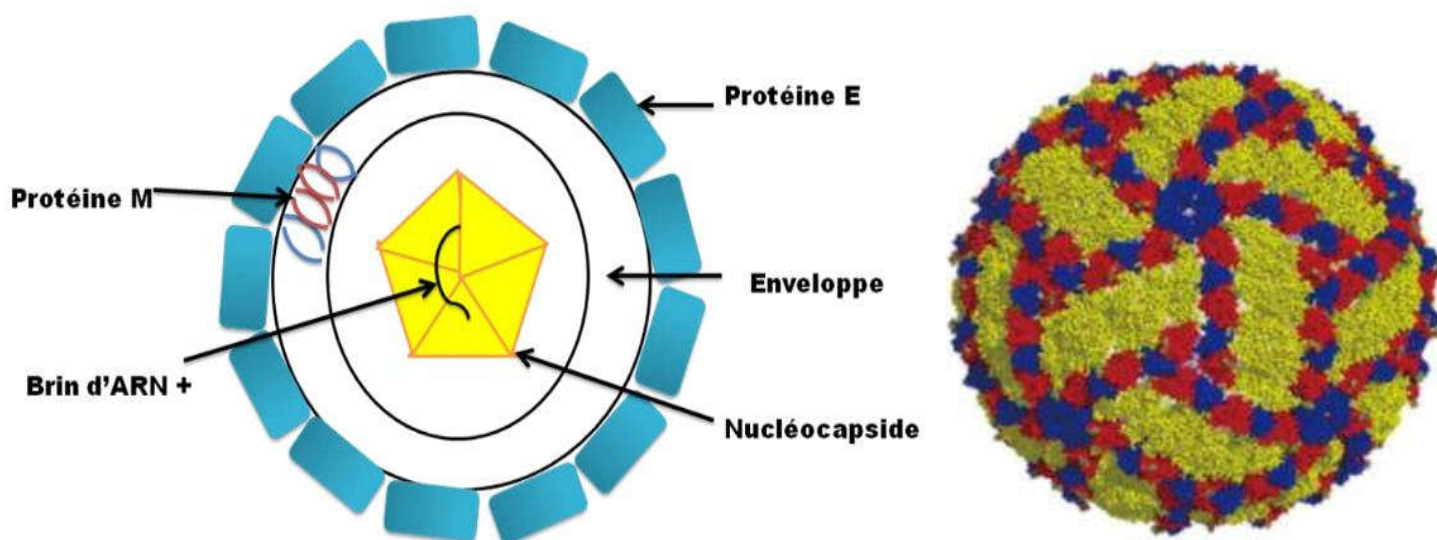


Figure 1.2: Schéma structurel du virus West Nile d'après (Petersen et al, 2001).

1.3. Cycle de multiplication viral:

La première étape du cycle viral est l'attachement du virus sur la surface cellulaire qui implique une interaction entre la protéine d'enveloppe E et des récepteurs spécifiques de la surface cellulaire (Figure 3). Les récepteurs DC-SIGN, alphaVbeta3 integrin (**Bogachek et al, 2010**) et la minin-binding protein (**Bogachek et al, 2008**) ont été rapportés comme potentiel récepteurs. Un processus d'endocytose récepteur-dépendante conduit alors à l'internalisation de la particule virale dans une vésicule à clathrines (**Chu & Ng, 2004**). Une acidification de l'endosome s'opère entraînant un changement de conformation de la protéine E et induisant ainsi la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane endosomale (**Gollins & Porterfield, 1986**). La nucléocapside est libérée dans le cytoplasme de la cellule hôte et l'ARN génomique est décapsidé. Ce dernier étant de polarité positive, fait office d'ARNm et est transcrit en une seule polyprotéine. La maturation protéolytique de la polyprotéine virale, puis de ces produits de clivage, génère les trois protéines structurales et les sept protéines non-structurales.

Les protéines virales NS3 et l'ARN polymérase ARN-dépendante NS5 (Rice et al, 1986; Poch et al, 1989) s'associent probablement à des protéines cellulaires pour former un complexe de réplication réalisant la synthèse de brins d'ARN (-). Ceux-ci servent à leur tour de matrice pour la synthèse de brins d'ARN (+) destinés soit à être traduits, soit à être encapsidés dans les virions en cours de maturation. Les protéines de capsid s'assemblent avec l'ARN viral pour former la nucléocapside. Les nucléocapsides nouvellement formées seraient ensuite internalisées dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE) selon un processus de bourgeonnement. La membrane du RE, dans laquelle sont ancrées les protéines E et protéine M, formerait ainsi l'enveloppe des virions immatures. Ces derniers seraient ensuite transportés, dans des vésicules de sécrétion, vers l'appareil de Golgi. Dans le réseau trans-golgien, il a été démontré qu'une protéase cellulaire assure la maturation de l'enveloppe virale par le clivage de prM en M (Konishi & Mason, 1993). La libération des virions dans le milieu extracellulaire se ferait ensuite par exocytose au travers de la membrane plasmique (Mukhopadhyay et al, 2005).

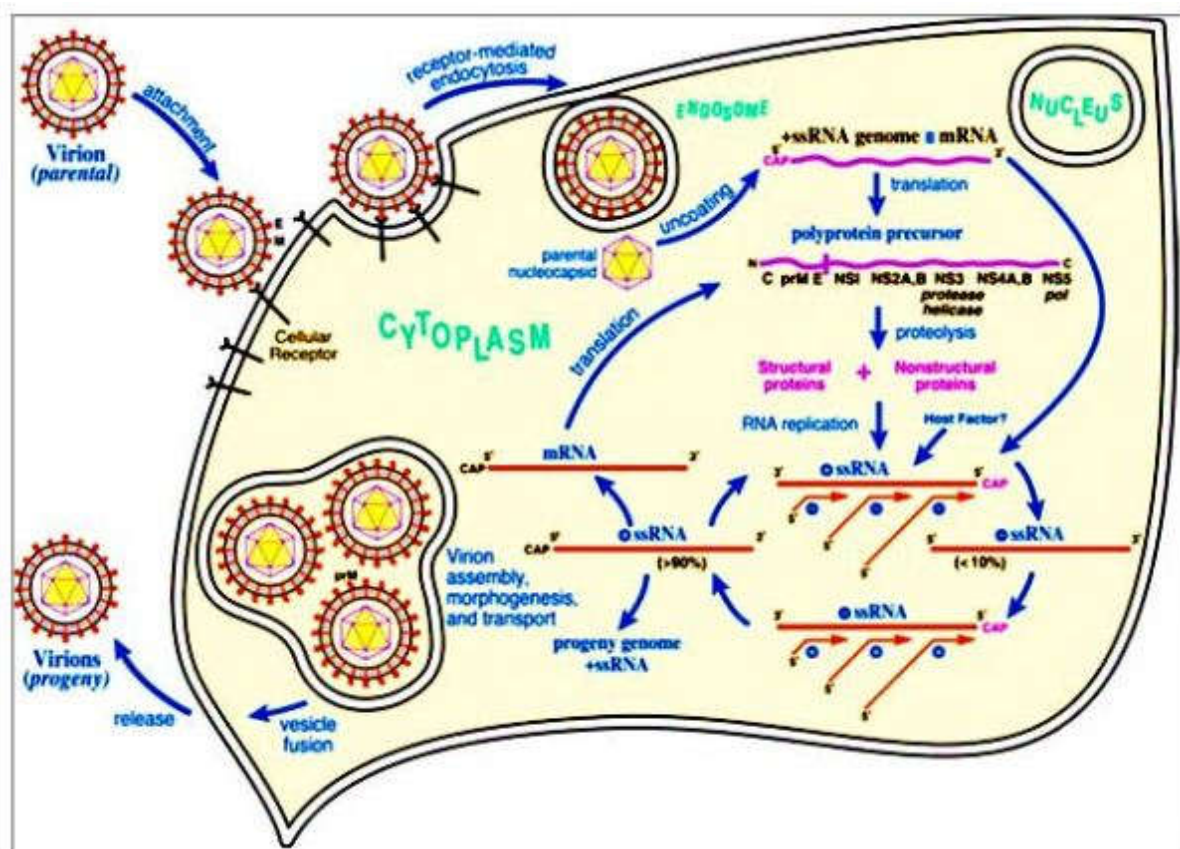


Figure 1.3 : Cycle de multiplication des Flavivirus (Samuel, 2002).

1.4. Symptomatique:

1.4.1. Chez l'homme:

L'infection est le plus souvent asymptomatique (80%) et ne motive pas une consultation médicale. Les manifestations cliniques sont constituées dans la majorité des cas par un syndrome pseudo-grippal « grippe estivale » faisant suite à une courte période d'incubation de quelques jours avec une résolution sans séquelles. La fièvre peut être modérée ou sévère. Les autres signes cliniques rencontrés lors d'infection sont céphalées, myalgies, arthralgies, asthénie, éruption cutanée (dans 50% des cas), pharyngite, manifestations digestives (nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales). Une faible proportion (environ 1%) des personnes ayant des signes cliniques présentent des formes graves avec des manifestations neurologiques à type de méningites aiguës ou encéphalites (un tiers de forme méningite et deux tiers ayant une composante encéphalitique). La mortalité liée à ces formes est variable et peut être estimée aux alentours de 10%. La fréquence des formes graves et un mauvais pronostic vital sont associés à l'âge de plus de 65 ans et à l'état du système immunitaire de patient **(Wiess D. et al, 2000)**.

Ces critères péjoratifs d'âge et d'altération d'immunocompétence sont plus fréquemment retrouvés chez les malades nécessitant une transfusion. Ces données ont été objectivées lors d'épidémie Nord-Américaine au cours de laquelle il a été décrit que les receveurs de produits sanguins contaminés (23 cas certains en 2002 et 06 en 2003) présentaient dans environ deux tiers des cas des formes cliniques neurologiques graves.

1.4.2. Chez les équidés:

L'infection à VWN peut donner des tableaux variés allant d'un simple syndrome pseudo-grippal à une encéphalomyélite mortelle. La maladie se manifeste généralement sous forme épidémique **(Cantile C. et al, 2000 ; Zientara S, 2000)**. La forme neurologique de l'infection équine est connue en Camargue sous le nom « Lourdige ».

L'infection expérimentale du cheval révèle que la maladie se traduit par deux formes complémentaires mais souvent dissociées, l'une de type myélitique subaigüe ou chronique, l'autre de type méningo-encéphalo-myélitique aiguë ou subaigüe **(Lapras M. ; Florio R. et al, 1968)**. Les symptômes liés aux deux formes sont récapitulés dans le tableau

Tableau 1.2: Symptomatologie lors d'incubation expérimentale de virus West Nile chez le cheval (Lapras M. ; Florio R. et al, 1968).

	Forme Myélitique	Forme méningo encéphalo-myélitique
Hyperthermie		+++
Abattement		Par alternance
Paraplégie	Oui	Oui
Mydriase		++
Absence de sensibilité localisée	+++	++
Abolition des réflexes tendineux	+++	
Diminution de reflex palpébral et photo-moteur	++	
Œdème de fond de l'œil	++	
Ataxie	++	+++
Hypermétrie		+++
Ptyalisme		++
Nystagmus		+
Crise convulsive		Rare

1.4.3. Chez les oiseaux:

L'infection des oiseaux par le VWN est généralement asymptomatique. Cependant, des manifestations cliniques (notamment neurologiques) ont été observées lors d'infection naturelle chez des pigeons et les corvidés.

Les symptômes généraux observés chez les oiseaux sont de l'anorexie, une faiblesse générale forçant l'oiseau à beaucoup dormir ou à rester au repos, une perte de masse et de pinçage des plumes à pulpe (**Glaser, 2004 ; Marra, Griffing et al, 2004**). Comme le virus West Nile est un virus neurotrope, on peut observer également de nombreux symptômes neurologiques associés aux symptômes généraux, que sont: ataxie, tremblement, désorientation, déplacement en cercle, vision et audition altérées,

positionnement anormaux de la tête et de cou, convulsions (**Steele ; Linn et al, 2000 ; Glaser, 2004 ; Marra, Griffing et al, 2004**).

Selon une étude expérimentale par le VWN (souche NY99) effectuée sur de nombreux espèce d'oiseau, il semblerait que la famille des corvidés soit particulièrement sensible (**Komar, Langevin et al, 2003**).

1.5. Traitement et prophylaxie :

1.5.1. Traitement :

1.5.1.1. Chez l'homme :

Malgré l'intérêt particulier à développer un traitement spécifique contre le virus West Nile durant cette dernière décennie, aucun traitement spécifique et efficace contre cette maladie n'a été décrit. Les essais cliniques pour le développement d'une thérapie spécifiques sont difficiles. En particulier, en raison de la logistique d'essai complexe, liée à la caractéristique sporadique de la maladie et aux difficultés des prévisions des manifestations d'année en année. En outre, le diagnostic de l'infection est toujours retardé et la majorité cas déclarés sont des vieux avec des complications graves (**Peterson, A. T., al ; 2003**), (**Sayao, A.L., al ; 2004**).

Le rôle des corticoïdes dans la maladie neuroinvasive reste controversé en raison du manque de preuves cliniques et de l'état d'immunosuppression qui peut empirer la maladie (**Kramer, A.H., al ; 2013**). En général, chez l'homme, on utilise trois molécules antivirales qui sont: Ribavirin, l'interféron α et les immunoglobulines.

Le Ribavirin est un analogue de la guanosine avec une activité in vitro rapportée contre plusieurs virus à ADN ou ARN, y compris les Flavivirus (**Huggins, J.W., 1989**). In vitro, le Ribavirin à de hautes concentrations empêche la réplication et l'effet cytopathologique du virus west nile dans des cellules nerveuses (**Jordan, I., al ; 2000**). Des essais cliniques de cette molécule chez les animaux sont contradictoires et ne montrent pas clairement l'efficacité de cette molécule (effet protecteur chez la souris et non protecteur pour les hamsters) (**Anderson, J.F., al ; 2002**), (**Morrey, J.D., al ; 2006**). La désconcordance des résultats in vitro et in vivo semble être due à la faible diffusion de la molécule dans le système nerveux

central (**Anderson, J.F., al ; 2002**). D'autres essais cliniques sont à exiger avant la commercialisation de la Ribavirin (**Tunkel, A.R., al ; 2008**).

Les interférons sont des glycoprotéines médiatrices de la réponse immunitaires innée contre les infections virales. L'effet inhibiteur de l'interféron α contre l'infection à VWN a été démontré in vitro avec des concentrations aisément réalisable dans le sérum humain (**Anderson, J.F., al ; 2002**). Aussi, une mortalité accrue est remarquée chez des souris déficientes en récepteur d'interféron α/β . Les données disponibles pour l'utilisation humaine sont manquantes (**Jackson. A.C., 2004**).

Les immunoglobulines spécifiques ont montré une efficacité dans le traitement de plusieurs Flavivirus (**Agrawal, A.G., al ; 2003**), (**Ben-Nathan, D., al ; 2009**). Les immunoglobulines ont donné des résultats satisfaisants chez les animaux en particulier chez les souris et les hamsters traités tôt (**Agrawal, A.G., al ; 2003**), (**Camenga, D.L., al ; 1974**), (**Morrey, J.D., al ; 2006**). Les données disponibles pour l'homme sont limitées à des rapports de cas de patients souvent traités tard au cours de la maladie clinique, montrant des résultats décevants (**Haley, M., al ; 2003**), (**Levi, M.E., al ; 2010**). Une molécule a été développée par ClinicalTrials.gov nommée NCT00068055 est en phase I d'essai (**National Institute of Allergy and Infectious Diseases [NIAID] 2014**). Les données disponibles restent insuffisantes pour recommander l'utilisation des immunoglobulines contre l'infection à VWN (**Timothy, J.G., al ; 2014**).

1.5.1.2. Chez le cheval :

Le traitement de l'infection à VWN chez les chevaux reste un traitement symptomatique et de soutien. Aucune thérapie spécifique efficace contre le virus n'est actuellement disponible (**Steinman, A., al ; 2002**), (**Johnson, A.L., 2011**). Les soins de soutien ne s'accompagnent pas toujours de succès (**Abutarbush, S. M., al ; 2004**). Cependant, des études récentes ont montré l'efficacité des immunoglobulines en IV chez les chevaux présentant des signes cliniques (**Johnson, A.L., 2011**).

1.5.2. La vaccination :

Le VWN a été isolé pour la première fois il y a plus de 70 ans (**Smithburn KC, al ; 1940**). Actuellement, il n'y a aucun vaccin commercialisé pour l'homme. Plusieurs vaccins restent encore en phase I ou II (stades expérimentaux) aux USA (**Beasley, D.W., al ; 2013**). Parmi les raisons qui empêchent le développement d'un vaccin humain, est le manque d'intérêt commercial, notamment son coût de production élevé ainsi qu'un marché très restreint pour l'homme (**Monath, T.P. 2001**). Dans ce contexte, Crucell Inc. a lancé une initiative pour le développement d'un vaccin mais plus tard ce projet est annulé (**Arun, V., al ; 2013**).

Contrairement à ce qui a été rapporté chez l'homme (absence de vaccins), de nombreux vaccins sont disponibles à usage vétérinaire. Un large nombre d'approches vaccinelles ont été testées chez la souris, les hamsters, les oiseaux, les chevaux et chez les primates non-humains. Les vaccins à usage humaine sont encore aux stades expérimentaux (Stade I et II).

1.5.2.1. Les vaccins humains :

Actuellement et malgré les nombreux efforts entrepris durant cette dernière décennie, aucun vaccin humain n'est disponible sur le marché.

Du fait que le virus WN appartient à un genre qui contient des virus avec plusieurs caractéristiques en communs tel que le virus de la dengue, de la fièvre jaune et de l'encéphalite japonaise, cela a permis aux scientifiques de développer des vaccins basés sur les découvertes vaccinelles précédentes ayant le pouvoir de contrôler la propagation de certains virus du même genre. Il est à signaler que plusieurs vaccins sont présentement à l'essai clinique.

Juste après la première épidémie du WN en USA en 1999, l'Institut National des Allergies et Maladies Infectieuses (NIAID) a commencé à travailler sur un vaccin nommé ChimeriVax-WN02 (**Epp, T., al ; 2007**). C'est un vaccin à virus atténué fabriqué en se basant sur le vaccin de la fièvre jaune commercialisé sous le nom de Yellow Fever 17D. Initialement, les gènes des protéines prM et E du virus de la fièvre jaune ont été remplacés par ceux du VWN formant le ChimeriVax-WN01. L'atténuation par mutation en protéine E mène vers le ChimeriVax-WN02 (**Cantile, C., al ; 2001**). Ce vaccin est en phase II et montre un pouvoir immunogène élevé et une bonne tolérance lors des essais cliniques (**Biedenbender, R., al ; 2011**), (**Repik, P.M., al ; 2012**). Un autre vaccin recombinant atténué et développé à partir

du virus de la dengue ainsi que des gènes du virus WN (WN/DEN4-3Delta30) a été décrit (références). Ce vaccin exprime les protéines prM et de l'enveloppe du VWN. Aussi, ce vaccin reste en phase d'essai clinique (Phase I). Le VRC est un autre vaccin à ADN pour l'homme. Il a donné des bons résultats en phase I d'essai expérimental (**Martin, J.E., al ; 2007**), (**Ledgerwood, J.E., al ; 2011**). D'autres vaccins sont en phase d'essai clinique comme le HBV-002 (nommé encore WN-20E) développé à partir de la protéine E (sans le domaine transmembranaire de cette protéine) et des vaccins recombinants (**Ledizet, M., al ; 2005**).

Le tableau suivant (Tableau 1.3) résume les principaux vaccins expérimentaux pour l'homme:

Tableau 1.3 : Les vaccins contre le VWN en cours de développement clinique.

Table . West Nile virus vaccine candidates under clinical development.

Vaccine Candidate	Antigen	Clinical Trial Phase
ChimeriVax-WN02	Yellow Fever 17D expressing WNV PrM/E	II
WN/DEN4-3' delta30	Dengue virus 4 expressing WNV PrM/E	I
VRC	DNA expressing PrM/E	I
HBV-002	Soluble E protein (no membrane domain)	I

1.5.2.2. L'immunité passive :

La sérovaccination a été employée pour la prophylaxie passive de nombreuses maladies comprenant le VWN. Plusieurs essais sur des souris ont donné des résultats satisfaisants (**Ledizet, M., al ; 2005**), (**Wang, T., al ; 2001**), (**Engle, M.J., al ; 2003**), (**Ledizet, M., al ; 2007**). La prophylaxie passive a également été employée chez l'homme avec des résultats encourageants. Deux patients traités en Israël par l'administration en IV d'anticorps

Omr-IgGs ont montré des améliorations spectaculaires (Shimoni, Z., al ; 2001), (Hamdan, A., al ; 2002).

1.5.2.3. La vaccination chez les animaux :

Plusieurs vaccins sont développés chez les animaux. Le tableau (Tableau 1.4) récapitule les vaccins licenciés pour les animaux (De Filette, M., al ; 2012):

Tableau 1.4: Les vaccins commercialisés et les vaccins en stade clinique

Table 2 Overview of the different commercialized and candidate West Nile vaccines.

Name	Viral antigen(s)	State of development	Reference
West Nile-Innovator (Pfizer)	Whole virus	Commercialized for horses	[63]
RecombiTek (Meril)	WNV prM-E in canarypox virus	Commercialized for horses	
West Nile-Innovator DNA	Plasmid DNA prM/E	Licensed for horses	[23]
PreveNile (Intervet)	WNV prM-E in yellow fever backbone	Commercialized for horses (recalled in 2010)	
Vetera West Nile vaccine (Boehringer Ingelheim)	Killed virus	Commercialized for horses	
ChimeriVax (Sanofi)	Yellow fever PrM-E substituted by WNV prM-E	Phase II human clinical trial	[5,8]
WN-DEN4	WNV prM-E in dengue-4 backbone	Phase II human clinical trial	[72]
VRC303 (NIAID/Vical)	Plasmid encoding WNV prM and E	Phase I human clinical trial	[41]
STF2ΔEIII	S. typhimurium flagellin fused to E domain III	Evaluated in mice	[55]
WNV-E _T	Truncated protein E	Evaluated in mice and horses	[19,42]
SRIP	prM-E VLPs	Evaluated in mice and horses	[12]
RepliVAX WN	Single-cycle West Nile virus	Evaluated in mice [118], hamsters [119], non-human primates [120]	
	Plasmid encoding E domain III fused to P28	Evaluated in mice	[22]
DIII-C-AP205	E domain III coupled to bacteriophage AP205	Evaluated in mice	[87]
FLU-NA-DIII	E domain III inserted into NA of influenza	Evaluated in mice	[54]
CAdVax-WNV1	C, prM, E and NS1 expressed in adenovirus	Evaluated in mice	[81]

CHAPITRE II :
EPIDEMIOLOGIE DU VIRUS WEST NILE

2. CHAPITRE II

EPIDEMIOLOGIE DU VIRUS WEST NILE

2.1. La répartition géographique :

L'épidémiologie du virus WN est toujours en évolution. Le virus est isolé initialement chez une femme fébrile en 1937 en Ouganda (**Smithburn, Kc., al ; 1940**). Depuis cette découverte, à l'exception de l'épidémie d'Israël en 1950 et celle de la France en 1960, seulement quelques cas sporadiques chez l'homme et les équidés ont été rapportés, en Albanie, la Bulgarie, Belgique, Ukraine, et Moldavie (**Hubalek, Z., al ; 1999**). Jusqu'aux années 90, la maladie chez l'homme était sans grande importance car juste des syndromes fébriles et les complications neurologiques sont rares (**Murgue, B., al ; 2001**), (**Hyes, C.G., al ; 2001**). À partir de 1994, on assiste à la multiplication d'épidémies importantes d'encéphalites à virus West Nile dans le bassin méditerranéen et en Europe (**Murgue, B., al ; 2001**), (**Dauphin, G., al ; 2004**). Son statut peu pathogène est remis en question.

Des épidémies de plusieurs dizaines à centaines de cas sont recensées en Algérie en 1994 (**Le Guenno., al ; 1996**), en Roumanie en 1996, en Tunisie en 1997 (**Triki, H., al ; 2001**), en Russie en 1999 (**Platonov, A., al ; 1999**) et en Israël en 2000 (**Weinberger, M., al ; 2001**). En fin août 1999, le virus est introduit aux USA où il a causé des cas d'encéphalites chez l'homme accompagnés d'encéphalites équine et de la mort de plusieurs centaines d'oiseaux sauvages (**Garmendia, A.,al ; 2001**). Le virus est étendu progressivement vers le Canada, l'Argentine et le Brésil (**Randolph, S.E., al ; 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, Hongrie, en Israël, en Italie, en Macédoine, dans le territoire palestinien, en Roumanie, en Russie, en Serbie, en Espagne, en Ukraine, en Tunisie, en Turquie et en Grèce (2010-2012) (**Calisteri, P., al ; 2010**), (**Sibru, A., al ; 2011**). La figure ci-dessous (Figure 2.1) montre la répartition spatiale de virus à travers le monde.

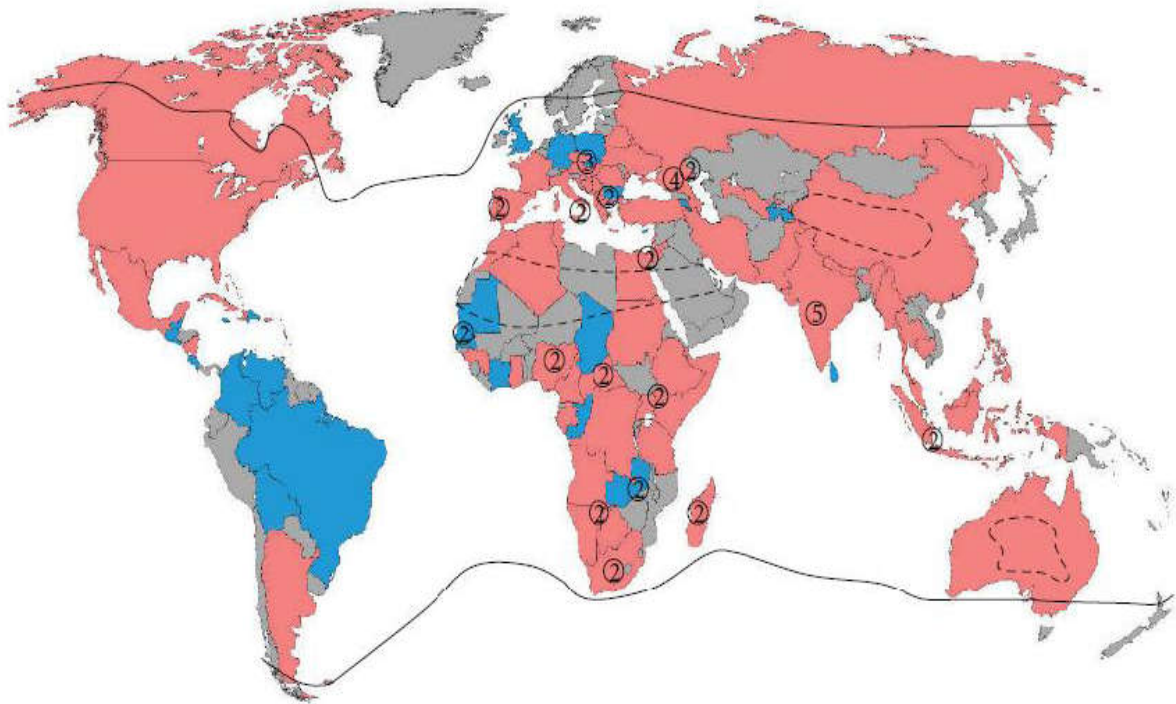


Figure 2.1 : Distribution globale du virus West Nile dans le monde.

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. Pour le Japon la Corée du sud, la Finlande et la Suède : la séropositivité est seulement signalée pour des oiseaux migrateurs non-résidents sans indication de transmission locale. Kiding et al ont rapporté des infections chez des gorilles près des frontières du République du Congo et de Rwanda (**Chancey, C., al ; 2015**).

2.2. Lignages et souches :

2.2.1. 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., al ; 2011**).

Les analyses phylogénétiques s'appuyant sur le séquençage des ARN viraux et la comparaison des séquences obtenues, montrent une variabilité génétique 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).

Le lignage 1 peut être divisé en 03 clusters : cluster 1a représente le virus isolé en Afrique, en Europe, en Moyen orient et en Amérique. En 2011, le 1a de VWN a été isolé pour la première fois en Inde **(Blakrishnan, A., al ; 2013)**. Jusque à ce moment le cluster 1a contient tous les isolats des épidémies d'encéphalite humaine **(Lanciotti, R.S., al ; 1999)** ; le cluster 1b correspond au virus Kunjin (KUNV) isolé en Australie, cette souche est considérée comme un subtype de VWN **(Hall, R.A., al ; 2001)**. Le 1b est une cause rare de la maladie humaine, la plus grande épidémie causée par cette souche est celle déclarée chez les chevaux en Australie en 2011 **(Frost, M.J., al ; 2012)**. Le troisième cluster 1c correspond aux virus isolés en Inde **(Beasley, D., al ; 2005), (Lanciotti, R.S., al ; 2002)**.

Le lignage 2, initialement isolé en Afrique, où il cause des syndromes fébriles bénignes chez l'homme **(Lanciotti, R.S., al ; 1999)**. Rarement responsable d'épidémies. Cependant, en 2004 et 2005, le virus appartient à ce lignage a été identifié chez des oiseaux sauvages en Hongrie, rapidement propagé vers l'Europe centrale **(Bakonyi, T., al ; 2005), (Bakonyi, T., al ; 2006)**. Des cas aviaires, équin et humains due au lignage 2 ont été rapportés en Russie, la Hongrie, l'Italie et la Grèce **(May, F.J., al ; 2011), (Nash, D., al ; 2001), (Magurano, F., al ; 2012), (Barzon, L., al ; 2013)**.

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), (Hubalek, 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.,**

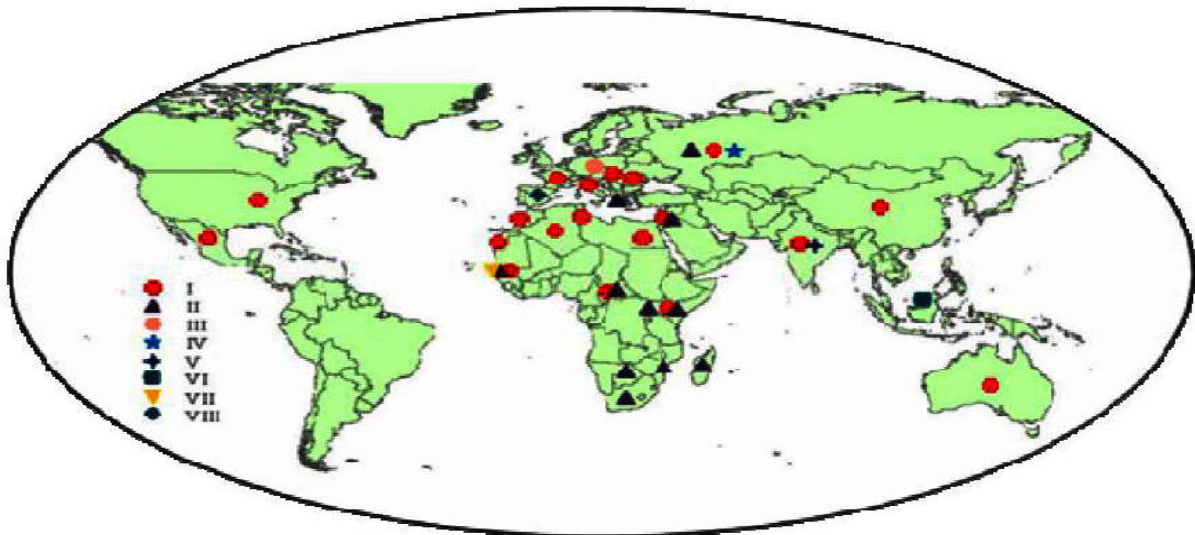


Figure 2.3 : Distribution géographique des différents lignages du VWN

(Ahmadnejad, F., al ; 2006).

2.3. Cycle de transmission :

Le cycle de transmission du WNV est très complexe car il fait intervenir de nombreux acteurs. Le virus WN est maintenu dans la nature par le cycle de transmission enzootique entre les oiseaux hôtes amplificateurs et les moustiques ornithophiles comme vecteurs. Un passage accidentel peut se produire entre des moustiques et des mammifères (figure 2.4). Ce cycle est identifié dans les années 50 par des études menées en Egypte (Brault, A.C., al ; 2009).

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. salinarus*, *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. visbnui* et *Cx. tritaeniorhynchus* en Asie (Brault, A.C., al ; 2009), (Hayes, E.B., al ; 2005), (Hall, R.A., al ; 2002).

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)**.

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)**. Ce mécanisme est très important pour l'entretien du virus pendant les périodes froides en absence de moustiques adultes. La transmission entre moustiques a été également documentée **(Higgs, S., al ; 2005)**.

Les moustiques s'infectent lors d'un repas sanguin en ingérant le virus. 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 **(Hayes, E.B., al ; 2005)**.

Le virus a été aussi isolé à maintes reprises à partir d'autres arthropodes hématophages. Il a été isolé de différentes espèces de tiques molles (*Argasidae*), des tiques dures (*Ixodidae*) et d'autres acariens nidicoles **(Mumcuoglu, K.Y., al ; 2005)**. Cependant, l'acquisition de virus durant le repas sanguin n'indique pas nécessairement la compétence vectorielle des arthropodes pour la transmission de virus **(Diamond, M.S., al ; 2009)**.

Plusieurs expériences de laboratoires sur des ixodides ont montré l'incapacité de ces dernières à transmettre le virus à d'autres hôtes. **(Reisen et al., en 2007)** ont montré que les tiques juvéniles d'*ixodidae* maintiennent le virus par transmission trans-stadiale jusqu'au stade adulte, mais non transmis à la descendance. *Ixodes pacificus* maintient le virus acquit sur un moineau virémique. Cependant, incapable de transmettre le virus à un autre moineau naïf. Alors, il semble que les tiques dures ne jouent aucun rôle dans la transmission. La situation est différente pour les *Argasidae*, certaines espèces de tiques molles s'infectent sur des animaux septicémiques (taux inférieurs à 50%) et elles sont capables de transmettre le virus durant plusieurs centaines de jours après exposition. **(Hutcheson et al ; 2005)** ont

démonstré que *Carios capensis* (tique molle) peut transmettre le virus après 35 jours, 10 mois pour *Carios coniceps*, 45 jours pour *Ornithodoros erraticus* (Vermeil, C., al ; 1960), 57 à 224 jours pour *Ornithodoros moubata* (Lawrie, C.H., al ; 2004), et 418 jours pour *Argas reflexus* (Hannoun, C., al ; 1970).

En revanche, la présence de virus dans les ectoparasites laisse supposer qu'il existe un risque de transmission aux oiseaux par voie orale si les parasites infectés sont ingérés (Komar, N., al ; 2003), (Anderson, J.F., al ; 2003).

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 en absence des moustiques (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). Une étude aux USA a montré que, le geai bleu, le Quiscale bronzé, la corneille d'Amérique et particulièrement le moineau sont parmi les plus importants amplificateurs de l'infection à VWN (Komar, N., al ; 2003). Les oiseaux domestiques sont considérés comme des hôtes accidentels de virus car la plupart des espèces, excepté des oies domestiques ne développent pas de virémie suffisante pour assurer la continuité du cycle. Des études expérimentales ont montré que les oies domestiques (*Anser anser anser*) produisent un niveau suffisant de virémie après infection (Swayne, D.E., al ; 2001).

Beaucoup d'espèces d'oiseaux secrètent des grandes quantités de virus dans leurs excréments et sécrétions orales une fois infectés par le VWN (Komar, N., al ; 2003), laissant suggérer une transmission directe oiseau-à-oiseau et même des oiseaux à l'homme. L'infection orale expérimentale de l'avifaune est démontrée, et une transmission proie prédateur est suggérée (infection des corbeaux en Amérique et des rapaces en Hongrie) (Garmendia, A.E., al ; 2000), (Zientara, S., al ; 2010).

Bien que la mortalité aviaire élevée n'avait été rapportée qu'à la fin des années 1990 en Israël et en 1999 aux USA (Swayne, D.E., al ; 2001), (Bernard, K.A., al ; 2000), (Bin, H., al ; 2001). Cependant, des centaines d'espèces représentant plus de 20 familles sont

sensibles (**Martin-Acebes, M.A., al ; 2012**). Il est avéré que les espèces les plus sensibles appartiennent aux passériformes, en particulier les corvidés (**Komar, N., al ; 2003**).

L'homme, les équidés et autres mammifères sont sensibles à l'infection. L'apparition des cas est lié à une circulation importante du virus dans l'avifaune et la présence des moustiques vecteurs (**Murgue, B., al ; 1998**). Ils sont considérés comme des culs-du- sac épidémiologiques car la réplication virale n'aboutit pas à une virémie suffisante pour assurer une transmission efficace au vecteur. À titre d'exemple, la virémie chez un cheval infecté expérimentalement est de l'ordre de 10³ UFP/ml (**Bunning, M.L., al ; 2002**), insuffisante pour soutenir le cycle.

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.

En dehors des mammifères et oiseaux, plusieurs reptiles et amphibiens tels que les serpents, crocodiles, alligators et les grenouilles (**Kostiukov, M.A., 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 (**Martin-Acebes, M.A., al ; 2012**).

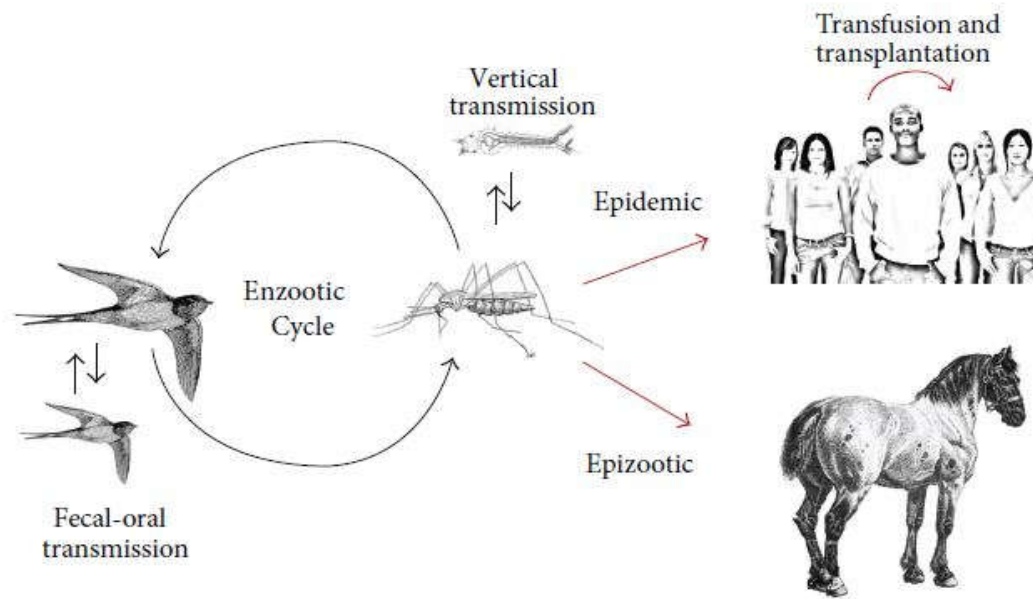


Figure 2.4 : Représentation schématique de cycle de transmission du VWN: Le virus WN transmet par les moustiques aux oiseaux. Plusieurs espèces sont des hôtes accidentels (modifié) (Dauphin, G., al ; 2007).

2.4. La situation de la maladie en Algérie :

2.4.1. Données historiques sur la maladie :

2.4.1.1. 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 Corroler 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.

2.4.1.2. Enquêtes sérologiques sur la fièvre du nil occidental :

A. 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).

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 WN1.

En 1994, dans le sud ouest algérien (Timimoune, 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%.

Tableau 2.1 : Récapitulatif des enquêtes sérologique menées en Algérie
(Benjelloun A.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)	Timimoune	18	P= 83,3% 2 cas douteux non comptabilisés

B. 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 suivant (Tableau 2.2) :

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

CHAPITRE III

ETUDE EXPERIMENTALE

3. CHAPITRE III

ETUDE EXPERIMENTALE

3.1. 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., al ; 2001**). En Algérie, sa première isolation 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 notre pays avec des symptômes chez une cinquantaine de personnes 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 les pigeons en Algérie avec pour objectifs:

- 1) Evaluer la situation sanitaire de la fièvre du nil occidental chez l'amplificateur dans la wilaya de Tizi-Ouzou et Bouira.
- 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:

Takerbouzt est le plus grand village kabyle en Algérie située dans la Commune d'Aghbalou, Daïra de M'chedellah Wilaya de Bouira. Elle est située entre 36° 25' 05'' Nord 4° 20' 34'' Est, limitée au Nord par le Parc national de Djurdjura, à l'Est par le village de Bahalil (Wilaya de Bouira), au Sud par le village de Chorfa (Wilaya de Bouira) et à l'Ouest par le village de Selloum (Wilaya de Bouira). (Figure 3.1).

Mahbane est un village kabyle située dans la Commune de Boghni Daïra de Boghni, Wilaya de Tizi-Ouzou. Elle est située entre 36° 30' 02'' Nord - 3° 59' 24'' Est, limitée au nord par le village de Taguemounte (Wilaya de Tizi-Ouzou), à l'Est par le village Assi Youcef (Wilaya de Tizi-Ouzou), au sud par la Wilaya de Bouira et à l'Ouest par le village d'Ath Koufi (Wilaya de Tizi-Ouzou). (Figure 3.2).

Le climat de la dernière décennie est caractérisé par des étés chauds et des hivers doux mais pluvieux (pluviométrie 800 à 950 mm à Takerbouzt, et 450 à 500 mm à Mahbane) avec un ensoleillement très élevé ([Wikipedia.html](#)).

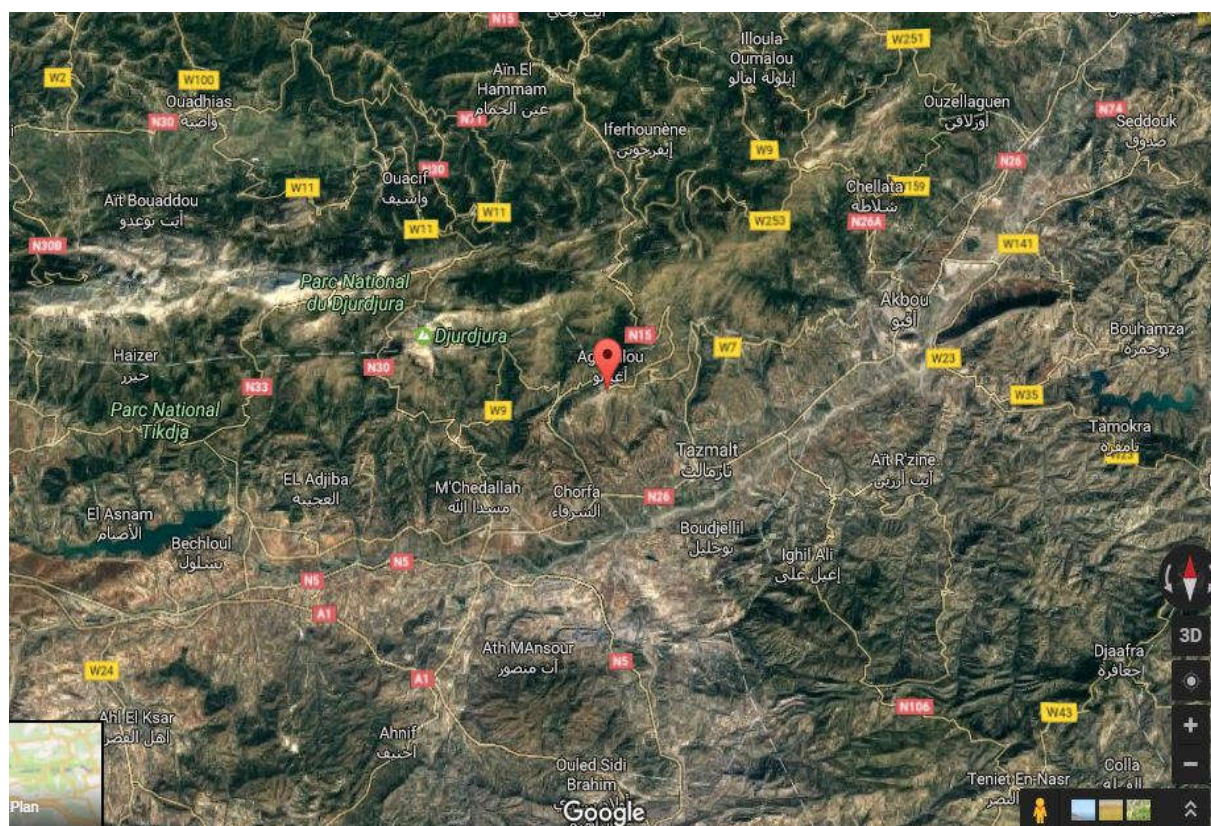


Figure 3.1 : La région d'étude Takerbouzt (Google-earth).



Figure 3.2 : La région d'étude Mahbane (Google-earth).

3.1.1.3. Population d'étude :

3.1.1.3.1. Oiseaux sédentaire :

Une seule espèce sédentaire et péridomestique (fréquente à proximité des habitations) a été choisie parmi la liste des oiseaux amplificateurs jouant un rôle clé dans l'émergence du Virus West Nile: le pigeon biset domestique «*Columba livia*». (Figure 3.3).

Le choix du pigeon 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 pigeon biset domestique «*Columba livia*». (Photos personnelles).

3.1.1.4. Capture des oiseaux et Période d'étude :

❖ Méthode de capture :

Les pigeons sont capturés à l'aide d'utilisation de filets japonais (Figure 3.4), ou capturer à la main dans l'obscurité (la nuit) au niveau des charpentes des maisons.

❖ Choix du cite de piégeage :

Les pigeons ont été capturés dans deux villages différents, un situé dans la Daïra de M'chedellah à savoir Takerbouzt Wilaya de Bouira, L'autre situé dans la Daïra de Boghni village de Mahbane Wilaya de Tizi-Ouzou.

❖ Période de capture :

La capture du sujet est faite durant la période hivernale (Décembre - Janvier) avant la période d'accouplement.



Figure 3.4 : Filet japonais pour les oiseaux (Photo personnelle 2017).



Figure 3.5 : pigeon dans une charpente de maison (Photo google).

3.1.1.5. Définition de 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 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 à 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:

3.1.1.7.1. Méthode de prélèvement :

Le sang est prélevé dans des tubes secs et identifié individuellement après sacrifice des sujets. La quantité de sang recueillie varie entre 3,5 et 4 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. Analyse 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.

3.1.1.8.1. 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 kit 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 Bouisettes, 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 ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) et $+ 5^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3^{\circ}\text{C}$).

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 (H_2SO_4 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 (± 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 (± 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°C ± 3 °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 (± 6 min) à température ambiante du laboratoire 21°C (± 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 (± 3 min) à température ambiante du laboratoire 21°C (± 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:

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

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 DOCN doit être supérieure à 0,700 (DOCN > 0,700).
- le rapport de la moyenne des contrôles positifs sur la moyenne des contrôles négatifs doit être inférieur à 0,3 (DOCP / DOCN < 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 ≤ 40: échantillon positif.
- 40 < % S/N ≤ 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.

3.2. Résultats :

3.2.1. Bilan de capture :

40 oiseaux d'une seule espèce (Pigeon) ont été capturés durant la période de piégeage, ces animaux ont été capturés et prélevés dans deux régions différentes dont Tizi-Ouzou (Mahbane) 19 oiseaux capturés et Bouira (Takerbouzt) 21 oiseaux capturés.

Tableau 3.1 : Distribution des oiseaux selon la région de capture

Lieu	Région 1 (Takerbouzt)	Région 2 (Mahbane)
Nombre	21	19
Pourcentage %	52,5	47,5

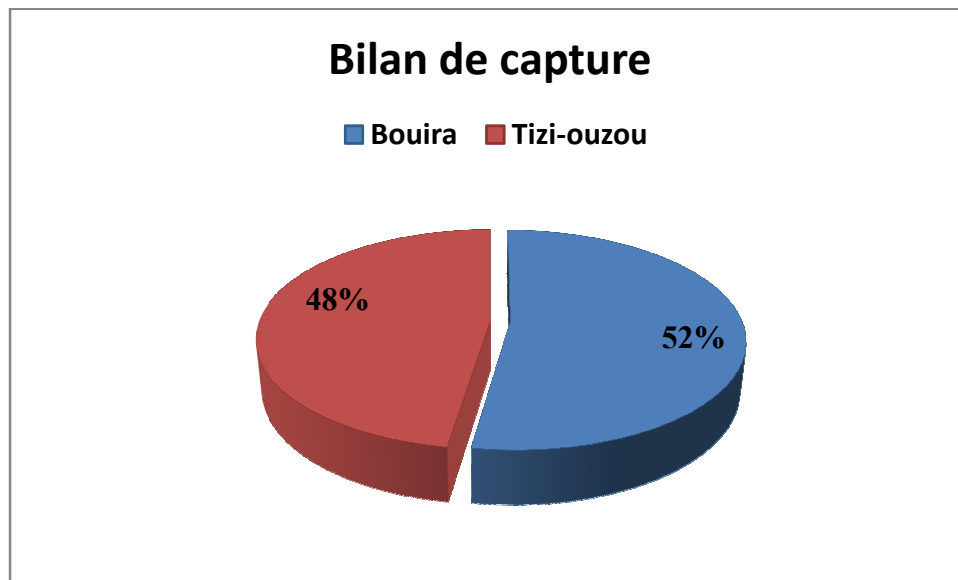


Figure 3.6 : Bilan de capture selon la région.

3.2.2. Résultats sérologique :

3.2.2.1. Résultats d'ELISA par compétition :

3.2.2.1.1. Séroprévalence globale :

40 prélèvements ont été préparés pour le test ELISA, 3 prélèvements n'ont pas été pris en compte dans ce test (sérums avec hémolyse). Sur les 37 sérums d'oiseaux restés et testés par la technique ELISA de type compétition capture IgG, 4 oiseaux se sont montrés séropositifs au test ($S/N \% \leq 50$) ce qui correspond à une séropositivité de 10,81% (4/37) 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	4	33
Pourcentage %	10.81	89.19
Nombre global	37	

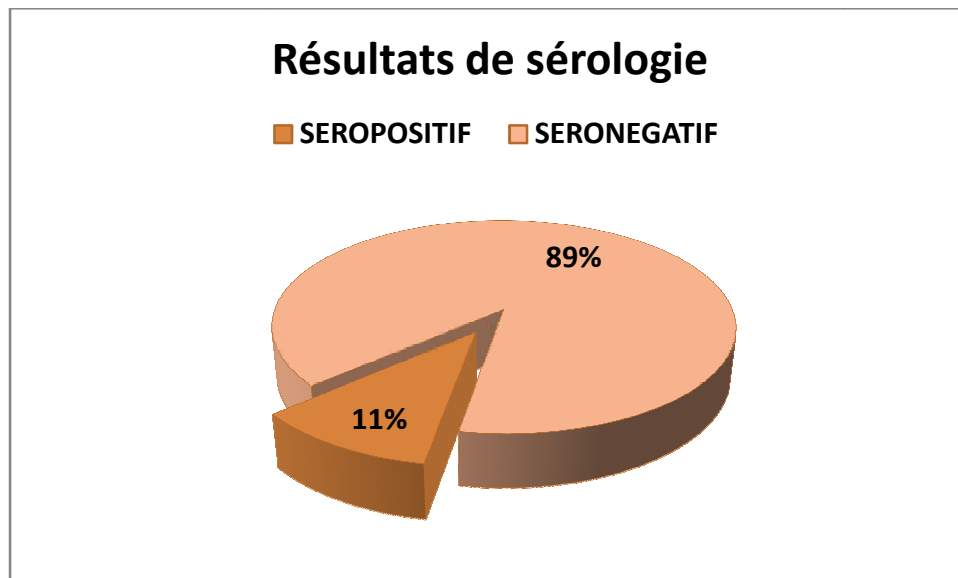


Figure 3.7 : Séroprévalence globale par la technique ELISA

3.2.2.1.2. Séroprévalence en fonction de site de capture :

Parmi les 16 sérums d'oiseaux capturés à Tizi-Ouzou 3 se sont montrés séropositifs au test ELISA. Et sur les 21 sérums d'oiseaux capturés au niveau de Bouira 1 seul est montré séropositif au test.

Tableau 3.3 : Séropositivité en fonction de site de capture.

	Effectifs	N séropositif	% séropositivité	%séronégativité
Site 1 (Tizi-Ouzou)	16	3	18,75	81,25
Site 2 (Bouira)	21	1	4,76	95,24

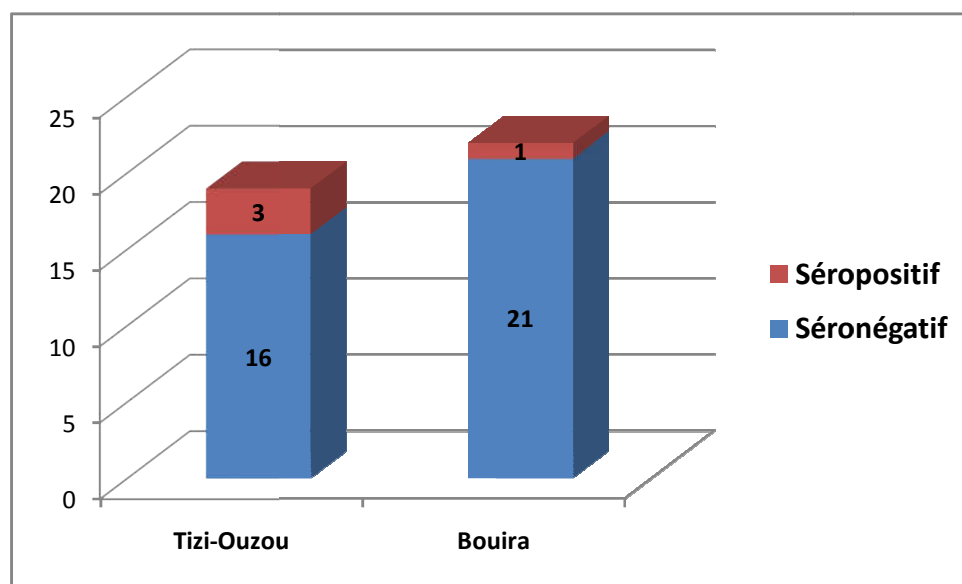


Figure 3.8 : Résultats en fonction de site de capture.

3.3. Discussion :

3.3.1. Echantillonnage :

Cette présente étude a pour objectif de détecter des marqueurs immunologiques du virus West Nile chez des oiseaux sédentaires (les pigeons) dans deux régions différentes (Tizi-Ouzou et Bouira) pour apprécier la vraie situation épidémiologique de cette arbovirose. Les prélèvements étaient basés sur un échantillon aléatoire simple (la sélection est aléatoire c'est-à-dire les sujets ont la même probabilité de chance d'être dans l'échantillon). Cependant, dans le cas de l'avifaune sauvage, le tirage est quasiment impossible d'être aléatoire freiné d'une part par l'impossibilité d'avoir une liste exhaustive de tous les sujets et d'autre part par les maints biais de sélection (technique de piégeage, refus, vol.....).

Le choix de la population d'étude est guidé par deux critères essentiels à savoir : l'abondance de l'espèce visée et la facilité relative de capture de cette dernière (**Wobeser, G., al ; 1994**).

Dans notre travail, la taille de l'échantillon reste insuffisante pour répondre au vrai objectif qui est d'étudier la prévalence réelle du ce virus dans les régions concernées car la précision relative est assez faible. Cette étude a été heurtée à plusieurs facteurs limitant à savoir le temps consacré (ce genre d'enquête doit être longitudinale) et le matériel (un seul Kits d'analyse pour deux PFE). Au terme de cette enquête et malgré tous les obstacles rencontrés ce travail nous a permis d'avoir une idée globale sur la situation de la maladie dans ce territoire.

3.3.2. Population d'étude :

Le choix de la population d'étude est justifié par l'abondance de l'espèce incluse mais réellement par le rôle d'indicateur épidémiologique joué par la famille des colombidés cette dernière développe une faible virémie mais qui garde des anticorps anti-VWN durant plusieurs années (**Zeller et Murgue, 2001**). Pour cette étude 37 sujets ont été inclus.

Il est à souligner qu'avant ce travail rien n'était connu sur la situation sérologique du VWN chez les pigeons en Algérie, cette enquête reste la première.

3.3.3. Technique 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 2008**). Par conséquent, ce test sérologique utilisé était adapté au concept de cette enquête de séroprévalence car il permettait 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 (test de référence).

3.3.4. Etude de séroprévalence :

C. Prévalence globale :

Le résultat global de sérologie indique que 10,8% des sujets testés sont positifs au VWN, ce qui suggère une faible prévalence endémique. Ce taux peut être expliqué par le caractère endémique du virus dans la région d'étude (**Murgue, B., al ; 2001**). Cette séroprévalence vient aussi consolider les résultats obtenus par MEDROUH et al en 2015 chez les oiseaux migrateurs et sédentaires en Kabylie (**MEDROUH, B., et al., 2015**) et aussi les résultats rapportés par (**Younes-Bouacida, N.S.,al ; 2013**) qui a signalé une prévalence de 12% chez les chevaux dans le centre de l'Algérie, avec une séropositivité plus élevée chez les chevaux vivants au voisinage des oiseaux migrateurs et sédentaires (résultats non communiqués). De plus, la maladie circule périodiquement en Afrique du Nord, signalée dans les pays voisins, en Tunisie (**Bargaoui, R., al ; 2012**) et au Maroc (**World Animal Information Database**).

La séroprévalence détectée dans cette enquête pourrait soutenir l'hypothèse proposée par plusieurs auteurs dans plusieurs pays à savoir le rôle probable des oiseaux migrateurs dans l'introduction du virus dans des régions indemnes et le rôle de l'avifaune sédentaire dans l'amplification et la circulation de cet arbovirus (**Zeller, H., al ; 2004**), (**Schuffenecker, I., al ; 2005**), (**Figuerola, T., al ; 2007**), (**Gangoso, L., al ; 2010**).

Nos résultats semblaient être proches de ceux obtenus par MEDROUH et al., et par ceux rapportés par YOUNES DOUACIDA avec des séroprévalence de 7,8% [3,8%-11,8% à IC de 95%] et de 12% respectivement chez des oiseaux et chez des chevaux de centre algérien (**MEDROUH, B. et al., 2015**), (**Younes-Bouacida, N.S., al ; 2013**). Ce taux est également similaire à celui rapporté par (**Figuerola, T., al ; 2008**) en Espagne (10,4%) en utilisant la technique de la séroneutralisation. Enfin, nos résultats semblaient proches de ceux rapportés par (**Llopis, I.V., al ; 2015**) en Italie avec une prévalence obtenue de 4,3% chez des oiseaux sauvages en utilisant le test de référence du VWN.

La séroprévalence rapportée dans notre étude semblait être inférieure à celle déclarée dans l'enquête réalisée par (**Diaz, L.A., al ; 2008**) en Argentine, cette séroprévalence s'élève à 25,6%. Cette différence pourrait être justifiée par la taille de la population animale et de la diversité des espèces étudiées (117 espèces). Il faut noter que (**Bargaoui, R., al ; 2012**) ont rapporté une séroprévalence de 24% chez les oiseaux sauvages en Tunisie. Cette fluctuation dans les prévalences pourrait être due aux zones humides où les prélèvements ont été effectués (un écosystème favorable à la transmission de cette arbovirose).

D'autres travaux ont rapporté des taux nettement plus faibles comparant à notre étude. Citons l'exemple des travaux de (**Iopés, G., al ; 2011**) dans le Sud de l'Espagne qui ont montré une prévalence de 2,2%. Cette différence est probablement due à la technique utilisée dans leur travail (L'IF).

Cependant, Ces résultats doivent être considérés avec prudence vue les nombreuses réactions croisées rencontrées avec les autres flavivirus de même séro groupe notamment avec le virus Usutu qui est largement répandu en Europe et en Afrique. Il faut aussi savoir que ces résultats ne donnent pas des informations sur le moment où les séropositifs sont infectés ni sur l'éventuelle circulation du virus dans l'environnement car les IgG persistent longtemps dans les sérums des animaux (**Petersen, L.R., al ; 2002**).

D. Séroprévalence en fonction du site de capture :

A l'issue de notre étude, nous avons enregistré un taux de séropositivité de 18,75% et de 4,76% dans la wilaya de Tizi-Ouzou et Bouira respectivement. Ces résultats montrent qu'il y a aucune relation statistiquement significative entre le site et le taux de

l'infection (Test de Khi2 corrigé de Yets $p(p\text{-value})= 0,4950$). Ce résultat pourrait être expliqué par le fait que les deux régions sont proches (situées au centre les deux) et présentent le même climat et le même relief (les conditions géo climatiques sont semblables).

Il semble alors que le site de capture n'est pas un facteur de risque dans notre enquête, ce qui corrobore avec les résultats rapportés par **(Hammouda, A., al ; 2015)** où aucune différence significative n'a été relevée dans la séroprévalence des moineaux capturés à Kébili (1/54 une séropositivité de 1,8%) et ceux capturés à Gabès (1/154 un taux de 0,65%). En revanche, **(Diaz, L.A., al ; 2008)** ont rapporté une différence significative entre les sites de capture, cette différence a été expliquée par les variations climatiques entre les lieux de capture.

CONCLUSION

CONCLUSION

Peu d'enquêtes sont consacrées en Algérie à étudier les flavivirus et en particulier le Virus West Nile. La vraie situation épidémiologique de ce dernier demeure inconnue. En effet, depuis l'épidémie de 1994, plusieurs points d'interrogations entourent cette arbovirose. Cependant, le virus à déclaration obligatoire dans notre pays et à un intérêt médical et économique considérable.

Cette présente enquête nous a permis d'avoir un aperçu vague sur la réelle situation du VWN. Nous avons détecté une faible séroprévalence chez les pigeons des deux régions concernées à savoir Tizi-Ouzou et Bouira. L'ELISA par compétition a révélé une prévalence globale de 10,81% dans la population étudiée avec des taux de séropositivité de 18,75% et de 4,76% respectivement à Tizi-Ouzou et à Bouira.

Même si la prévalence est faible, le risque de réémergence de ce virus est à ne pas écarter vue de nombreuses considérations (Les mouvements des oiseaux migrateurs, les changements climatique....Etc.).

Enfin, le site de capture n'est pas un facteur de risque pour notre étude. Cependant, ces résultats doivent être considérés avec prudence vue la taille de l'échantillon réduite mais aussi vue le manque de spécificité de test utilisé.

RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES

Dans les pays indemnes ou bien dans les pays où le VWN est endémique ; l'introduction de nouvelles souches plus virulentes pourraient 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 animal 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.

REFERENCES

- 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 Vossbrück, 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 alphaVbeta3 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 and 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 $\alpha\beta 3$ 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., Mejlom, 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.
- Kostiukov, 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, WE., 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-encéphalomyélite du cheval à arbovirus équino-humain (west nile) isolé en Camargue : *Le Journal de médecin de Lyon* 49 (150) : 1423-41.
- Lawrie, C.H., Uzcategui, N.Y., Gould, E.A., et Nuttal, P.A., “Ixodid and argasid tick species and West Nile viru”, *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.
- Lvov, 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., Etude épidémiologique du Virus West Nile dans la région de Tizi-Ouzou. Thèse de Magister Institut des science vétérinaire Université BLIDA I (2015) p 167.
- 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 trestre 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=2010&semester=0&wild=0&country=MAR&thiscountrycode=MAR&detailed=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.