

UNIVERSITE BLIDA-1

Institut des Sciences Vétérinaires

Thèse de Doctorat

en Sciences Vétérinaires

Spécialité : Epidémiologie animale

**Oiseaux sauvages et virus West Nile :
Épidémiologique du virus West Nile dans certaines
zones humides algériennes**

Par

Bachir MEDROUH

Devant le jury composé de :

A. BERBER	Professeur, U. de Blida-1	Président
M.H. JEMLI	Professeur, ENMV Sidi Thabet	Examineur
A. HAKEM	Professeur, U. de Djelfa	Examineur
k. SAIDANI	M.C.A., U. de Blida-1	Examineur
I. LAFRI	M.C.A., U. de Blida-1	Promoteur
I. BITAM	Professeur, U. de Blida-1	Co-promoteur

Blida, août 2020

RESUME

Le virus West Nile (VWN) et le virus Usutu (VUSU) sont deux arbovirus appartenant au genre flavivirus et à la famille des flaviviridae. Ces deux virus sont largement répandus dans le bassin méditerranéen. Ils sont maintenus dans la nature dans un cycle enzootique Oiseau-Moustique-Oiseaux, les oiseaux comme amplificateur et les moustiques ornitophiles comme vecteur. L'homme et les équidés sont des hôtes accidentels et des culs du sac épidémiologiques. Le rôle des oiseaux migrateurs dans la dissémination et la réintroduction des flavivirus dans des zones indemnes est bien documenté. 2,5 milliards d'oiseaux traversent deux fois par année la méditerranée pour relier les deux continents pour l'hivernage ou pour la reproduction. L'Algérie reste un site privilégié dans la voie de migration Paléarctique. Cependant, le rôle des oiseaux migrateurs et sédentaires dans l'éco-épidémiologie des flavivirus en général et le VWN en particulier reste mal exploré en Algérie.

Une étude séro-épidémiologique transversale sur l'avifaune sauvage a été menée dans la Kabylie. Les objectifs étaient d'évaluer la situation éco-épidémiologique du VWN dans certaines zones à risque, étudier le rôle des oiseaux dans l'introduction et la propagation le long de l'itinéraire migratoire et d'estimer le risque d'émergence.

297 prélèvements ont été effectués sur 04 espèces d'oiseaux sauvages à savoir *Turdus philomelos* et *Sturnus vulgaris* espèces migratrices et *Passer domesticus* et *Columba livia* deux espèces sédentaires pré-domestiques. Les sérums ont fait l'objet de screening pour les flavivirus à l'aide de test ELISA par compétition. Dans un second lieu, le test de séroneutralisation a été utilisé pour la confirmation des résultats de l'ELISA et dans le but aussi de détecter des anticorps anti-Usutu. L'ELISA a montré une séroprévalence globale de 8,3% [IC : 4,9-11,7%] et une séropositivité de 13,6%, 6,3%, 1,5% et 10% pour la grive, l'étourneau, le moineau et le pigeon respectivement. La séroneutralisation sur microplaque a confirmé une prévalence du VWN de l'ordre de 6,6% [IC 95% : 2,9-10,3%] avec une positivité de 8,6% et de 4,1 % chez la grive et le moineau deux espèces concernées par ce second test. Aucun cas des sérums positifs testés n'est révélé positif à VUSU.

Enfin, une prévalence de 3% pour les flavivirus autres que VWN et VUSU. Dans notre étude, Seul le site de capture qui est un facteur du risque pour le VWN ($p=0,03989$). Aucune association statistiquement significative n'est observée entre les facteurs espèce, sexe, et la séropositivité. Notre étude a confirmé pour la première fois la circulation du VWN chez l'avifaune sauvage dans le nord centre algérien.

Mots clés : virus West Nile, virus Usutu, éco-épidémiologie, Oiseaux sauvages, séroprévalence, Kabylie.

SUMMARY

West Nile virus (WNV) and Usutu virus (USV) are two arboviruses belonging to the genus flavivirus and the family flaviviridae. Both viruses are widespread in the Mediterranean basin. They are maintained in nature in an enzootic Bird-Mosquito-Bird cycle, with birds as an enhancer and ornitophilic mosquitoes as a vector. Humans and equids are accidental hosts and epidemiological dead ends. The role of migratory birds in the dissemination and reintroduction of flaviviruses in free areas is well documented. 2.5 billion birds cross the Mediterranean twice a year to link the two continents for wintering or breeding. Algeria remains a privileged site in the Palearctic flyway. However, the role of migratory and sedentary birds in the eco-epidemiology of flaviviruses in general and VWN in particular remains poorly explored in Algeria.

A cross-sectional sero-epidemiological study on wild avifauna has been carried out in Kabylia. The objectives were to assess the eco-epidemiological situation of VWN in certain risk areas, to study the role of birds in the introduction and spread along the migratory route and to estimate the risk of emergence.

297 samples were taken from 04 species of wild birds, namely *Turdus philomelos* and *Sturnus vulgaris* migratory species and *Passer domesticus* and *Columba livia* two pre-domestic sedentary species. Sera were screened for flaviviruses using competitive ELISA tests. In a second step, the micro-neutralization test was used for confirmation of the ELISA results and also to detect anti-Usutu antibodies. The ELISA showed an overall seroprevalence of 8.3% [CI: 4.9-11.7%] and seropositivity of 13.6%, 6.3%, 1.5% and 10% for thrush, starling, sparrow and pigeon respectively. Micro-neutralization test confirmed a prevalence of VWN of 6.6% [95% CI: 2.9-10.3%] with a positivity of 8.6% and 4.1% in thrush and sparrow, the two species concerned by this second test. None of the positive sera tested were positive for SUV. Finally, there was a prevalence of 3% for flaviviruses other than VWN and SUSU. In our study, only the site of capture is a risk factor for VWN ($p=0.03989$). No statistically significant association was observed between the factors species, sex, and seropositivity. Our study confirmed for the first time the circulation of VWN in wild avifauna in north-central Algeria.

Key words: West Nile virus, Usutu virus, eco-epidemiology, wild birds, prevalence, Kabylia

الملخص:

فيروس "غرب النيل" (VWN) وفيروس Usutu (VUSU) هما فيروسان من فصيلة arbovirus ينتميان إلى فيروس من جنس flavivirus ولعائلة flaviviridae. فيروسان منتشران بكثرة في حوض البحر المتوسط. يتم الاحتفاظ بها في الطبيعة في دورة enzootique الطيور - البعوض - الطيور ، الطيور المضخمة للفيروسات والبعوض ornitophilic باعتبارها ناقلات، البشر والخيول هم مستقبلون عرضيون ونهايات مسدودة للأوبئة. إن دور الطيور المهاجرة في نشر وإعادة إدخال فيروسات flavivirus في المناطق الحرة وموتفة جيداً 2.5 . مليار طائر يعبرون البحر الأبيض المتوسط مرتين في السنة لربط القارتين لقضاء الشتاء أو التكاثر. تعتبر الجزائر موقعاً متميزاً في معبر Paléarctique ومع ذلك ، فإن دور الطيور المهاجرة والمستقرة في علم البيئة الوبائي لفيروسات flavivirus بشكل عام و VWN على وجه الخصوص لا يزال استكشافه ضئيل في الجزائر.

أجريت دراسة مقطعية الوبائية المصلية على الطيور البرية في منطقة القبائل. كانت الأهداف هي تقييم الوضع الوبائي لـ VWN في بعض مناطق الخطر، ودراسة دور الطيور في إدخال والانتشار على طول مسار الهجرة وتقدير خطر ظهور المرض.

تم أخذ 297 عينة من 04 نوعاً من الطيور البرية، وهي أنواع Turdus philomelos و Sturnus vulgaris المهاجرة و Passer domesticus و Comumbialivia نوعان من المستوطنات السابقة للحيوانات المستقرة.

تم فحص الأمصال بحثاً عن فيروسات flavivirus باستخدام اختبار ELISA التنافسي. ثانياً، تم استخدام اختبار التصلب المصلي لتأكيد نتائج ELISA ولغرض اكتشاف الأجسام المضادة لـ Usutu. أظهرت ELISA معدل انتشار مصلي إجمالي قدره 8.3 % [CI: 4.9-11.7 %] [إيجابية المصلية بنسبة 13.6 % ، 6.3 % ، 1.5 % و 10 % للقلاع ، الزرزور والعصفور والحمام على التوالي. أكد التحديد المصلي على صفيحة ميكروية انتشاراً لشبكة VWN بحوالي 6.6% [95% CI: 2.9-10.3 %] مع إيجابية 8.6% و 4.1% في القلاع والعصفور، نوعان معنيان بهذا الاختبار الثاني. لم يتم العثور على أي حالات من الأمصال الإيجابية التي تم اختبارها لتكون إيجابية بالنسبة لـ VUSU. أخيراً، هناك انتشار بنسبة 3% لفيروسات فلافيا أخرى غير VWN و VUSU.

في دراستنا، فقط موقع الالتقاط وهو عامل خطر لـ VWN ($p = 0.03989$). لم يلاحظ أي علاقة ذات دلالة إحصائية بين الأنواع، والجنس، والعوامل المصلية. أكدت دراستنا لأول مرة تداول VWN في الطيور البرية في شمال وسط الجزائر.

، علم الأوبئة البيئية، الطيور البرية ، الانتشار المصلي، Usutu الكلمات المفتاحية: فيروس غرب النيل، فيروس

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde reconnaissance et mes chaleureux remerciements à mes directeurs de thèse **Mr LAFRI I.** maître de conférences à l'Institut des sciences vétérinaires Blida 1 et **Mr BITAM I.** professeur à l'Ecole Supérieure en Science de l'Aliment et des Industries Agroalimentaire d'Alger , d'avoir accepter de diriger ce travail, pour leurs disponibilités, pour leurs conseils précieux, pour leurs suivis et leurs orientations.

Je souhaite remercier Mr **BERBER A.** Professeur à l'université Saad Dahleb de Blida, qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury, qu'il trouve ici l'expression de ma parfaite reconnaissance et mes vifs remerciements.

Je tiens infiniment à remercier **Mr JEMLI M.H.** Professeur et Directeur d'Ecole Nationale Vétérinaires de Sidi Thabet de Tunisie d'avoir accepté notre invitation et qui ont pu se libérer de leurs nombreuses préoccupations pour ce joindre à nous ce jour pour être dans les jurys de ce travail.

Un énorme profond remerciement pour **Mr HAKEM A.** Professeur à l'université Ziane ACHOUR de Djelfa, qui nous a fait l'honneur d'examiner ce travail, qu'il soit assuré de ma vive reconnaissance.

Hommage respectueux.

Ma reconnaissance et mes remerciements d'adresse aussi :

A **Mr ZIAM H.** maître de conférence A à l'université Saad Dahleb Blida 1 et Mr **SAIDANI K.** maître de conférence A à l'université Saad Dahleb Blida 1, pour leurs présence pour moi à tout moment, leurs orientations, leurs encouragements et d'avoir se libérer pour rejoindre à nous ce jour en tant que jurys.

Ma gratitude s'adresse à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail, en l'occurrence Mme **LECOLLINET S.** et Mme **BECK C.** de laboratoire ANSES (France). **Mr HACHID A.** et Mme **BENBETKA C.** de l'Institut Pasteur d'Alger

Je remercie également la **Direction Générale des Forêts** et tout son personnel.

DEDICACE

Je dédie ce travail à mes **deux parents**

A ma famille

Pour leur amour, leur soutien, leur aide et leur sourire.

Ma profonde affection

A L. ABBAD

Pour tous les bons moments et pour tous ceux à venir.

Pour son encouragement, sa gentillesse et pour son amour

A tous mes amis

Pour leur bonne humeur, leur gentillesse et pour tous nos fous rires partagés

Pour m'avoir soutenue moralement quand les résultats n'étaient pas au rendez-vous

A M. Chatouane

Un père, un frère et un ami.

Avec tous mon respect.

A tous les enseignants de l'Institut des Sciences Vétérinaires Blida-1, et les enseignants de la faculté biologie en particulier mes collègues de département BPO.

TABLE DES MATIERES

RESUME.....	1
REMERCIEMENTS.....	4
TABLE DES MATIERES.....	7
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX.....	12
INTRODUCTION.....	16
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	19
CHAPITRE 1: Virus West Nile.....	19
1.1 Historique :.....	19
1.2 Virologie	21
1.2.1 Classification.....	21
1.2.2 Particule virale	21
1.2.3 Génome	23
1.2.4 Cycle de réplication.....	24
1.3 Réponse immunitaire	27
1.4 Pathogénèse et pathogénie	29
1.5 Aspect clinique	30
1.5.1 Homme	30
1.5.2 Oiseaux.....	31
1.6 Diagnostic du laboratoire.....	32
1.6.1 Détection virale	32
1.6.1.1 Isolation du virus	32
1.6.1.2 Méthodes immunologiques	33
1.6.1.3 Méthodes moléculaires.....	33
a. PCR en temps réel (RT PCR).....	33
b. Transcription inverse couplée à une PCR.....	34
1.6.1.3 Tests sérologiques.....	35
a. Séroneutralisation.....	35

b. Test d'inhibition d'agglutination et fixation de complément	35
c. Technique ELISA	36
1.7 Traitement et prophylaxie	38
1.7.1 Traitement	38
1.7.1.1 Chez l'homme	38
1.7.1.2 Chez Le cheval	39
1.7.2 Vaccination	39
1.7.2.1 Vaccins humains	39
1.7.2.2 Immunité passive	40
1.7.2.3 Vaccins vétérinaires	40
CHAPITRE 2 : EPIDEMIOLOGIE DU VIRUS WEST NILE	41
2.1. Distribution spatiale et temporelle du VWN	41
2.2 Epidémiologie moléculaire : Phylogéographie	43
2.3 Ecologie et cycle de transmission	45
2.4 Virus West Nile en Algérie	49
2.4.1 Isolement du virus	49
2.4.2 Surveillance et détection du VWN en Algérie	49
2.4.2.1 Chez l'homme	49
2.4.2.2 Chez les animaux	50
2.5.3 Système de surveillance du VWN en Algérie	50
2.5 Rôle des oiseaux dans l'épidémiologie du virus West Nile	52
2.5.1 Notion des oiseaux compétents	52
2.5.2 Oiseaux migrateurs et virus West Nile	53
2.5.3 Avifaune en Algérie	54
CHAPITRE 3 : ETUDE EXPERIMENTALE	55
3.1 Matériel et méthodes	55
3.1.1 Protocole de l'enquête	55
3.1.1.1 Problématique et objectifs	55
3.1.1.2 Localisation géographique de la zone d'étude	56

3.1.1.3 Population d'étude	57
3.1.1.3.1 Espèces migraterices	57
3.1.1.3.2 Espèces sédentaires	59
3.1.1.4 Définition de cas	61
3.1.1.5 L'échantillonnage	61
3.1.1.5.1 La capture	61
3.1.1.6 Analyses du laboratoire	65
3.1.1.6.1 ELISA compétition	65
3.1.1.6.1.1 Principe :	65
3.1.1.6.1.2 Description de Kit	67
3.1.1.6.1.3 Objectifs et domaines d'application :	67
3.1.1.6.1.4 Appareillage et matériels	67
3.1.1.6.1.5 Réactifs et produits	67
3.1.1.6.1.5.1 Contenu de la trousse commerciale	67
3.1.1.6.1.5.1 Conditions de conservation	68
3.1.1.6.1.5.1 Précautions	68
3.1.1.6.1.5.4 Préparation de la solution de lavage	68
3.1.1.6.1.5 Préparation des échantillons	69
3.1.1.6.1.5 Mode opératoire	69
3.1.1.6.1.7.1 Etape de repartition	69
3.1.1.6.1.7.2 Incubation	70
3.1.1.6.1.7.3 Lavage	70
3.1.1.6.1.7.4 Etape du conjugué	70
3.1.1.6.1.7.5 Etape du chromogène substrat	70
3.1.1.6.1.8 Expression des résultats	71
3.1.1.6.1.8.1 Calculs	71
3.1.1.6.1.8.2 Validation du test	71
3.1.1.6.1.8.3 Expression des résultats	71
3.1.1.6.2 Séroneutralisation	72
3.1.1.6.2.1 Objet et domaine d'application	72
3.1.1.6.2.1 Hygiène et sécurité	72
3.1.1.6.2.1 Principe de la méthode	73
3.1.1.6.2.2 Matériels nécessaires	73

3.1.1.6.2.3 Réactifs (chimiques et biologiques).....	73
3.1.1.6.2.4 Contenu du mode opératoire.....	74
3.1.1.7 Etude statistique	76
3.2 Résultats	77
3.2.1 Bilan de capture	77
3.2.2 Composition de l'échantillon	77
a. Etude d'espèce ratio	77
b. Etude sexe ratio.....	78
c. Distribution de la population selon le site de capture	78
3.2.3 Résultats de sérologie	79
3.2.3.1 Résultats de l'ELISA	79
3.2.3.1.1 Séroprévalence globale	79
3.2.3.1.2 Séropositivité en fonction de l'espèce.....	80
3.2.3.1.3 Séropositivité en fonction de region de capture	80
3.2.3.1.4 Séropositivité en fonction de site de sexe.....	81
3.2.3.2 Résultats du test de séroneutralisation.....	82
3.2.3.3.1. Résultats de séroprévalence globale	82
3.2.3.3.2. Résultats de séroprévalence en fonction de l'espèce	83
3.2.3.3.2.1. Virus west nile	83
3.2.3.3.2.2. Autres flavivirus	85
3.2.3.3.3. Résultatats de séroprévalence en fonction du sexe	85
3.2.3.3.4. Résultatats de Séroprévalence en fonction du site de capture ..	86
3.2.3.3.4.1. Virus west nile	86
3.2.3.3.4.2. Autres flavivirus	86
3.3 Discussion.....	87
3.3.1 Choix de thème et population d'étude.....	87
3.3.2 Méthode d'échantillonnage et taille d'échantillon.....	88
3.3.3 Méthodes de laboratoire	89
3.3.4 Etude de la séroprévalence	90
3.3.4.1 Discussion des résultats VWN.....	90
3.3.4.1.1 Séroprévalence en fonction de l'espèce	92
3.3.4.1.2 Séroprévalence en fonction de la région.....	93
3.3.4.1.2 Séroprévalence en fonction de sexe.....	94

3.3.4.2 Discussion des résultats virus Usutu	96
CONCLUSION	96
RECOMMANDATION ET PERSPECTIVES	98
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	100

LISTES DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

A. LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Cryo-microscopie électronique de particules du virus West Nile	22
Figure 1.2 : Schéma de génome viral	23
Figure 1.6 : Cycle de réplication du VWN	26
Figure 2.1 : Distribution globale du virus West Nile dans le monde	42
Figure 2.2 : Les lignages du VWN	44
Figure 2.4 : Représentation schématique de cycle de transmission du VWN	48
Figure 3.1 : La localisation région d'étude (Tizi-Ouzou, Bejaia, Bouira)	57
Figure 3.2 : La grive « <i>Turdus philomelos</i> »	58
Figure 3.3 : Le moineau « <i>Passer domesticus</i> »	60
Figure 3.4 : Filet japonais placé pour la grive	62
Figure 3.5 : Filet japonais près d'habitations placé pour le moineau et les pigeons ..	62
Figure 3.6 : Pièges traditionnels	63
Figure 3.7 : Prélèvement du sang sur tubes secs	64
Figure 3.8 : Sérum conservé dans l'épandeur	65
Figure 3.9 : Plan de Plaque	72
Figure 3.10 : Schéma de Plaque	73
Figure 3.2.1 : Espèce ratio de la population d'étude	77
Figure 3.2.2 : Sexe ratio des moineaux	77
Figure 3.2.3 : Séroprévalence globale par ELISA	79
Figure 3.2.4 : Séropositivité en fonction de site de capture	81
Figure 3.2.5 : Séropositivité selon l'espèce par SNT	83
Figure 3.2.6 : Répartition des cas positifs selon le sexe des moineaux	85
Figure 3.2.7 : Répartition des cas positifs au VWN selon la wilaya	87

B. LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 : Rapport d'enquêtes du surveillance du VWN chez l'homme et les animaux en Algérie	51
Tableau 3.2.1 : Structure de la population d'étude	77
Tableau 3.2.2 : Distribution des oiseaux selon le site de capture	78
Tableau 3.2.3 : Résultat global de sérologie par ELISA de type compétition	79
Tableau 3.2.4 : Séroposivité selon l'espèce par la technique ELISA	80
Tableau 3.2.5 : Séroposivité des oiseaux en fonction de la wilaya	81
Tableau 3.2.6 : Séroposivité en fonction de sexe des moineaux	82
Tableau 3.2.7 : Résultats de la séroneutralisation pour les deux virus West Nile et Usutu	84

INTRODUCTION

La faune sauvage est de plus en plus en contact étroit avec l'homme, en raison d'une profonde modification des relations entre l'homme et l'écosystème naturel (la sécheresse, la dégradation des milieux naturels, explosion démographique, mondialisation des échanges...etc.). Elle représente une source d'agents pathogènes d'intérêt médical et vétérinaire [1]. En particulier, les oiseaux sauvages ont leur capacité de parcourir rapidement des grandes distances [2].

Deux fois par année, plus de deux milliards d'oiseaux voyagent entre l'Europe et l'Afrique pour rejoindre leur site d'hivernage ou de nidification en suivant un trajet de migration nommé Paléarctique [3]. Durant leur déplacement, les oiseaux sauvages peuvent véhiculer de nombreux microorganismes (des parasites, des bactéries et virus), susceptibles de conduire à l'émergence de maladies dans des zones jusqu'alors indemnes [4]. L'avifaune migratrice peut héberger des tiques immatures d'importance médicale et vétérinaire alors responsables de leur répartition géographique ainsi que les agents pathogènes qu'elles peuvent transmettre [5].

En plus, les oiseaux sont reconnus comme des réservoirs de plusieurs virus entre autres les agents des encéphalites virales [6], tels que le WNV et le USUV [7] et la présence de différents lignages et clades du WNV dans le bassin méditerranéen est contribué au déplacement des oiseaux dans des zones avec des moustiques et tiques en abondance [8,9]. Pour cela, l'étude du rôle des oiseaux dans l'émergence et la réémergence de certaines maladies s'avère très intéressant et même obligatoire pour bien évaluer le risque présenté par ces potentiels amplificateurs et vecteurs.

Le virus West Nile (WNV) et le virus Usutu (USUV) sont deux arbovirus appartenant à la famille des *Flaviviridae*, au genre *Flavivirus* et au sérocomplexe de l'encéphalite japonaise [10]. Les deux virus sont maintenus dans la nature dans un cycle enzootique qui fait intervenir les moustiques ornithophiles essentiellement de genre *Culex* comme vecteur et les oiseaux jouent le rôle de l'amplificateur [11]. L'homme, les équidés et autres mammifères sont des hôtes accidentelles

incapables de développer une virémie suffisante pour infecter à nouveau le moustique donc ils sont considérés comme des culs de sac épidémiologique [12].

Le WNV isolé initialement chez une femme fébrile en 1937 en Ouganda chez le sang d'une femme fébrile [13]. Le virus provoque chez l'homme un syndrome fébrile et approximativement 1% des cas développe des formes nerveuses graves [14]. Jusqu'à la fin des années 80, les épidémies à WNV étaient sporadique, surviennent dans quelques pays d'Afrique et les formes neurologiques étaient exceptionnelles [14]. Depuis les années 1990, la maladie a changé de statut, des épidémies à WNV plus graves par la fréquence des formes neurologiques sont survenues en Algérie 1994, en Roumanie 1996, au Maroc en 1996 et 2011, en Tunisie en 1997 et 2012, en Russie et aux Etats-Unis d'Amérique (USA) en 1999 [15–19], donc WNV est devenue un grand problème de santé, à la fois publique et vétérinaire en Europe et dans le bassin méditerranéen et en suite dans le nouveau monde.

En Algérie, tout comme dans le bassin méditerranéen, le WNV est considéré comme ré-émergeant [16]. Il a été isolé à l'institut Pasteur d'Alger en 1968 [20], depuis toutes les tentatives de l'isolement du virus n'ont pas abouti que se soit chez l'homme ou chez les animaux. Une épidémie est survenue en 1994 chez une cinquantaine de personnes avec 8 décès [19]. En 2012 un cas succombé au WNV à Jijel. Récemment, des enquêtes sérologiques ont détectés le virus chez les équidés à l'est algérien [21] et chez l'homme dans le nord centre algérien [22]. Cependant, nos connaissances relatives au rôle des oiseaux sauvages dans la circulation de ces *Flavivirus* sont limitées surtout en absence de système de surveillance actif des arbovirus en Algérie contrairement à nos voisins marocains et tunisiens.

Le USUV provoque un syndrome fébrile associé à des rashes mais il provoque des méningo-encéphalites parfois mortelles chez les immuno-déprimés. Cet arbovirus africain est très pathogène pour certaines espèces d'oiseaux en particulier les passeriformes (Ex. *Turdus* spp.) en causant chez ces derniers des encéphalites, des myocardites et des hépatites [23]. Il est mis en évidence pour la première fois en Afrique Du Sud en 1959 par M. Mc Intosh chez un moustique *Culex neavei* [24]. Depuis il a été isolé en Sénégal, en République centrafricaine,

Burkina Faso, Cote d'Ivoire, Nigeria et Ouganda [25] ; les anticorps Anti-Virus Usutu ont été détectés au Maroc chez des oiseaux sauvages [26]. A partir de 2001, le virus émerge en Europe, sa circulation été démontrée en Autriche, la Hongrie, la Suisse, l'Espagne, puis en Italie ; les Anticorps ont été détectés chez l'avifaune sauvage en Royaume-Unis, la Pologne et la république tchèque [27]. En Algérie, à notre connaissance aucune étude n'est consacrée par conséquent la situation de cet arbovirus demeure dans l'obscur.

Notre travail est destiné à faire le point sur le rôle de l'avifaune sauvage dans l'épidémiologie du WNV et USUV, pour cela nous avons fixé comme objectifs :

- (1) décrire la situation épidémiologique vis-à-vis des deux virus pour quelques espèces candidates.
- (2) Evaluer le risque de réémergence du WNV et la possibilité d'introduire des nouvelles lignages par le biais des oiseaux migrateurs.

CHAPITRE 1

Virus West Nile

1.1 Historique

En se basant sur des analyses phylogénétiques, le WNV a émergé comme un virus distinct il y a 1000 ans [28]. En 2009, le CDC (the Centers for Disease Control and Prevention) a rapporté que le WNV peut être une des causes possible de la mort d'Alexandre le grand qui est décédé après 10 jours de fièvre [29]. Ce n'est que plus tard qu'on rapporte des différents présages annonciateurs de cette maladie, dont la mort brutale des corbeaux. Certains auteurs ont cru reconnaître dans ces lignes et dans les symptômes d'Alexandre le grand, la première description de l'activité du WNV 323 avant J.C. près de l'actuelle Bagdad [30,31].

Le West Nile virus a été isolé pour la première fois en 1937 en Ouganda à partir du sang d'une femme de 37 ans souffrant d'une forte fièvre venant du West Nile district d'où son nom [13]. Treize ans après sa découverte, le WNV est isolé chez l'homme en Égypte, dans un village où il circule intensément (70 % de séroprévalence) [32]. Les premières études écologiques du virus sont dirigées dans ce pays, elles ont été remarquables dans la mesure où elles ont permis d'identifier les points clefs de l'épidémiologie du virus. Aujourd'hui, le virus est présent sur tous les continents à l'exception de l'Antarctique faisant de lui le virus le plus répandu au monde [33].

La première épidémie due au WNV a été rapportée en Israël (1951-1952) [34] où les premières manifestations neurologiques sévères ont été rapportées en 1957 et en 1962 [35]. Le virus a également sévi en France au courant de l'année 1962 [36] et en Afrique du Sud (1974, 1984-1986) [37] [38]. La maladie a été signalée pour la première fois chez les chevaux en Egypte et en France en début des années 60 [39].

A partir de 1994, le WNV regagne de l'activité dans l'ancien monde et des premiers cas humains ont été rapportés en Algérie [40]. 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 [15]. En 1999, 40 décès sont rapportés dans les villes de Volzskii et Volgograd, en Russie [17] et en 2000, 8 décès ont été rapportés en Israël [41]. 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 [16,42–45].

En 1999, le WNV est introduit aux USA (New-York), 62 cas d'encéphalite humaine (7 décès), 20 cas équins (9 décès) ainsi qu'une grande atteinte aviaire ont été observés [46,47]. Par la suite, le WNV a élargi son aire de distribution en atteignant l'ensemble des Etats-Unis ainsi qu'une grande partie du continent Américain du Canada [48] jusqu'en Argentine [49].

Depuis 2010, les épidémies à WNV sont multipliées et l'incidence des cas humains est dramatiquement augmentée. En 2010, une épidémie a frappé la Grèce avec 262 cas et 35 décès [50]. En 2011, plus de 712 et 110 cas ont été déclarés respectivement aux USA et au Canada [51]. Entre 2011-2017, 1832 cas ont été recensés entre l'Europe et les pays voisins [52]. En 2018, 1503 cas humains rapportés en Europe et 580 dans les pays voisins, sept fois plus que les cas enregistrés en 2017. Un total de 180 décès dans cette année [52].

1.2. Virologie

1.2.1. Classification

Le virus west nile (WNV) appartient à la famille des *Flaviviridae*, genre *Flavivirus* [53]. Ce genre regroupe 74 virus, dont la majorité est transmis par des moustiques ou par des tiques [54]. Le genre est subdivisé en 12 complexes taxonomiques, 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.) [55]. Le WNV fait partie du séro-groupe du virus de l'encéphalite japonaise [56]. Ce complexe comporte 10 virus à savoir : le virus de l'encéphalite japonaise, le virus de l'encéphalite Saint-Louis, le WNV, le virus de l'encéphalite *Murray valley*, le virus Kunjin, le virus Alfuy, le virus Koutango, le virus Usutu, le virus Kokobera et le virus stratford [54]. Bien que tous les isolats du WNV appartiennent au même séro-type, les études phylogénétiques ont montré l'existence de 2 lignages majeurs, plusieurs sous-types et clusters [56]

Les flavivirus ont des propriétés antigéniques proches, en particulier ceux du complexe de l'encéphalite japonaise, ce qui cause des réactions sérologiques croisées fréquentes [52].

1.2.2. Particule virale

La structure des particules virales de WNV a été élucidée. Le microscope électronique et les images de cryo-microscopie montrent des particules virales de symétrie icosaédrique résultat de la disposition des glycoprotéines [57]. Le virus est de 50 nm de diamètre [58] (figure 1.1), il s'agit d'un virus enveloppé à ARN simple brin à polarité positive d'environ 11 kb. Le génome est inclus dans une nucléocapside formée par une seule protéine, la protéine C qui constitue le noyau du virion. L'enveloppe est formée de deux protéines, une protéine d'enveloppe (E) et une protéine de la membrane (M) dont l'agencement confère une apparence lisse (figure 1.1) [57].

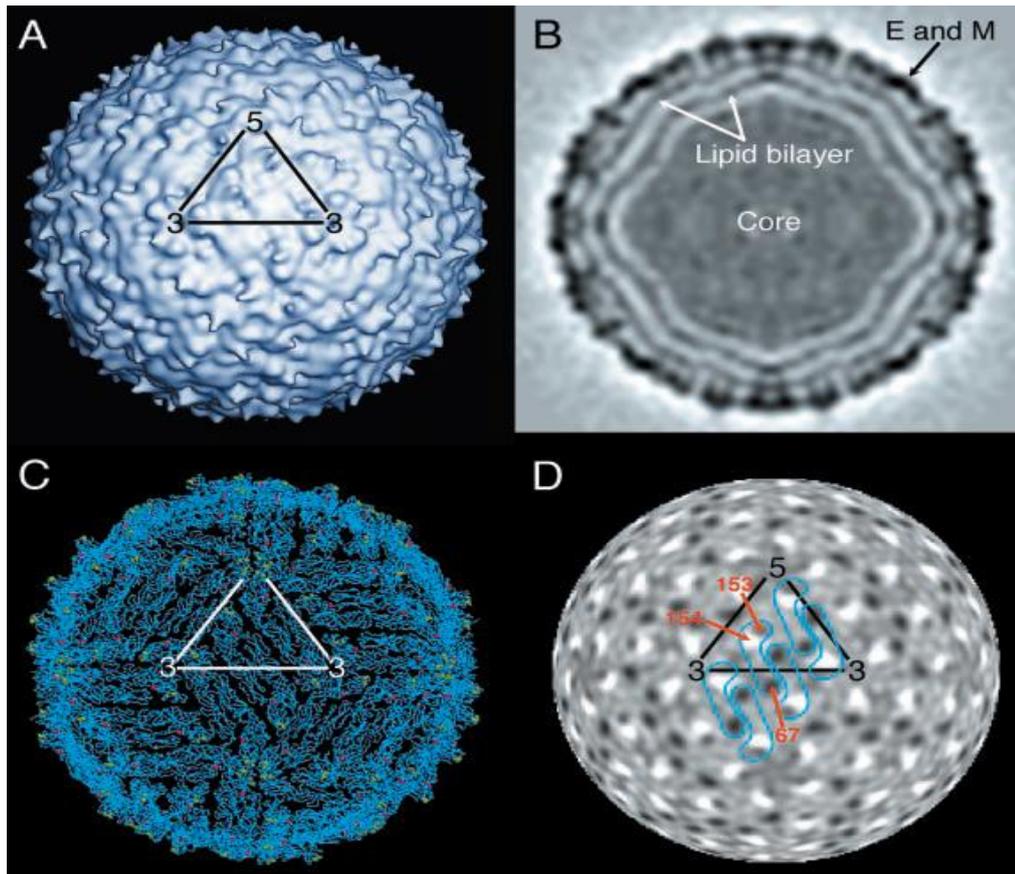


Figure 1.1 : Cryo-microscopie électronique de particules du virus West Nile. (A) la structure du virion est reconstituée d'après les données de cryomicroscopie électronique. Le triangle à la surface de la structure indique une unité asymétrique d'icosaèdre. (B) la reconstruction de la section centrale montre des couches concentriques de densité de masse correspondant à l'enveloppe. *Lipid bilayer* : bicouche lipidique, *Core* : noyau, *E and M* : E et M. (C) la disposition de la protéine E (la squelette Ca est représenté en bleu). Les résidus 307 et 330, qui se lient au anticorps neutralisant, sont représentés en vert. Le résidu Asn, qui est glycosylé, est représenté en rose. (D) carte de différence de densité entre le virus de la dengue et WNV. [57].

1.2.3. Génome

Le génome du WNV est constitué d'un ARN simple brin à polarité positive (figure 1.2). Ce génome comporte un seul cadre de lecture d'environ 11000 nucléotides. Il est coiffé à son extrémité par deux régions non codantes, 5' (7-méthylguanosine), non polyadényle en 3' [59]. Les régions non codantes (NC) sont nécessaires pour la transcription, la traduction et l'empaquetage de l'ARN viral [60]. Le génome est traduit en une polyprotéine qui est clivée pendant et après la traduction par des protéases cellulaires et virales. La polyprotéine code pour 10 protéines virales (figure 1.2). La partie 5' code pour des protéines structurales (C, PrM et E) et la partie 3' code pour sept protéines non-structurales, NS (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5) [59]. Les protéines structurales sont nécessaires pour la formation de la particule virale. Les protéines non-structurales jouent un rôle dans la réplication virale, l'assemblage des virions et l'évasion à la réponse antivirale de l'hôte [61–63].

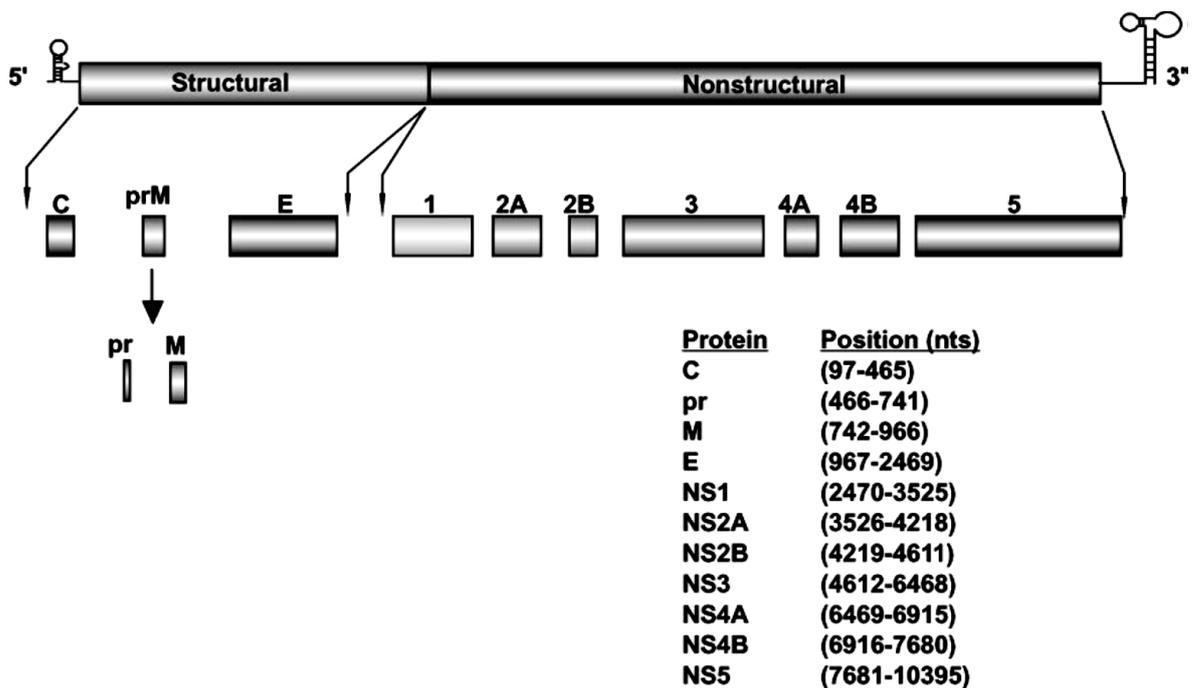


Figure 1.2 : Schéma de génome viral : la représentation du génome du WNV comprenant les 3 protéines structurales qui composent la particule du virion et les 7 protéines non-structurales nécessaire à la réplication et à l'invasion de l'immunité [59].

1.2.4. Cycle de réplication

Le virus WN est capable de se multiplier dans divers cultures cellulaires, à savoir les cellules aviaires, de mammifères, d'amphibien et d'insectes. Cependant, l'effet cytopathologique est observé dans quelques cultures mais pas dans d'autres, malgré l'efficacité de la réplication [64].

Les protéines cellulaires fonctionnent comme des corécepteurs pour l'attachement des virions et ce sont ces protéines qui facilitent la fusion/entrée des virus. Cependant, elles ne sont pas bien identifiées pour WNV ainsi que pour d'autres flavivirus. Divers glycosaminoglycans dont l'héparine ont été rapportés comme étant des récepteurs à faible affinité pour les flavivirus [65]. Bien que DC-SIGNR et DC-SIGN tous les deux lient le mannose riche en glycans, seulement DC-SIGNR assure efficacement l'infection [66]. La glycolysation de prM ou de E est suffisante à l'interaction de WNV avec le récepteur DC-SIGNR. A savoir que le WNV infecte plusieurs types cellulaires qui n'expriment pas ce récepteur, ce que suggère que, d'autres protéines cellulaires jouent le rôle de DC-SIGNR. Il été rapporté que le WNV s'attache aux globules rouges sans que les protéines réceptrices soient identifiées [67]. Il est rapporté que le WNV interagit avec $\alpha_v \beta_3$ intégrin [68], ce qui implique directement l'expression de ce récepteur à la sensibilité cellulaire. Le domaine III de la protéine E de plusieurs flavivirus (WNV y a compris) contient la séquence RGD/RGE, qui est le motif de reconnaissance d'intégrin. Une mutation à ce niveau pour le virus de la fièvre jaune n'affecte pas l'habilité du virus à infecter les cellules [69]. L'interaction à l'intégrin peut être assurée par d'autres régions de la protéine E ou alternativement par la prM. Cependant, des études récentes ont montré que ni $\alpha_v \beta_3$ intégrin ni une kinase-adhésion sont utilisées pour la rentrée de WNV [70]. Rab 5 a été rapporté nécessaire à la rentrée du virus de la dengue et du WNV [71]. Autres protéines rapportées comme des récepteurs putatifs pour les *Flavivirus* : GRP 87 (Bip), CD-14 associated molecules et HSP 70/90 [72].

Après attachement, l'entrée virale dans les cellules des mammifères ou d'insectes suppose l'internalisation de virus par endocytose [68,73]. L'abaissement du pH dans l'endosome entraîne le processus de fusion entre l'enveloppe et la membrane endosomale libérant ainsi la capsid. Le pH optimale,

le réarrangement et la fusion virale est 6,3-6,4 et ce processus dépend de la présence de cholestérol dans la membrane cible [74,75] (figure 1.3). Une fois dans le cytoplasme, l'ARN se traduit en protéines structurales et non structurales impliquées dans la réplication virale.

Les clivages protéiques sont co-translationnels et se font grâce à des protéases virales et cellulaires. Les protéines d'enveloppe doivent être glycosylées. Pour cela, elles doivent transiter dans le RE et le Golgi, ce qui nécessite une séquence signal. En cours de synthèse, des séquences signal adressent les régions prM, E et NS1 de la polyprotéine dans le RE grâce à des régions transmembranaires. Les séquences signal sont ensuite clivées par des signalases cellulaires. Les protéines prM et E restent ancrées dans la membrane alors que la protéine NS1 est libérée dans la lumière du réticulum et sera excrétée. La protéine prM sera clivée plus tardivement dans le trans-Golgi par des protéases de types furines résidentes du Golgi [59].

Sur la face cytoplasmique, la protéine NS3 nécessite NS2B comme cofacteur pour réaliser les clivages protéiques.

La réplication débute par la synthèse d'un brin d'ARN de polarité négative qui sert ensuite de base pour la synthèse d'un ARN génomique positif sous un mode semi-conservatif et asymétrique. La réplication est couplée à la traduction et à l'assemblage (figure 1.3). Le complexe de réplication s'assemble avec les protéines qui viennent d'être traduites. La réplication est également couplée à l'encapsidation.

L'assemblage des particules virales se fait par association de l'ARN avec les protéines de capsid. L'acquisition de l'enveloppe se fait par bourgeonnement au niveau du RE. La protéine prM sert de chaperon pour maintenir la conformation de la protéine E afin d'éviter l'exposition du peptide de fusion. Une fois le bourgeonnement réalisé, il y a formation de particules virales immatures avec un aspect hérissé correspondant à l'insertion d'hétérodimères prM-E dans l'enveloppe virale. Le clivage de prM en M se déroule dans l'appareil de Golgi permettant la maturation de la particule virale [76].

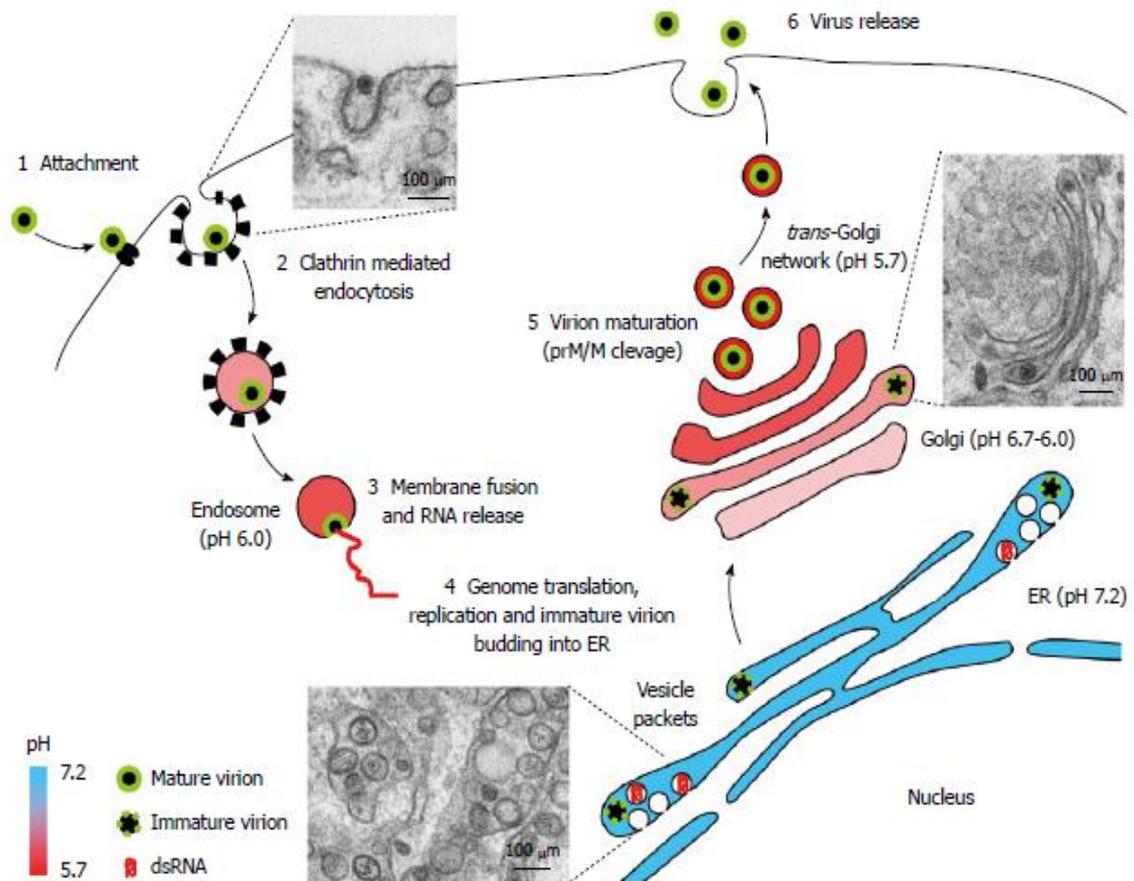


Figure 1.3 : Cycle de réplication du WNV. Vue schématique de cycle de réplication du WNV dans une cellule infectée. Les micrographes électroniques des cellules Vero infectées par le virus West Nile illustré par les différentes images du cycle infectieux: Rentrée des virions, formation des vésicules et transport des virions vers l'appareil de Golgi pour la maturation [77].

1.3. Réponse immunitaire

La réponse immunitaire contre le WNV est essentiellement à médiation humorale. Elle limite la dissémination virale en particulier au système nerveux central [78]. En effet, les immunoglobulines M (IgM) limitent la dissémination virale chez l'hôte vertébré. Elles sont détectées 2 à 8 jours après l'apparition des signes cliniques, soit 2 semaines après l'infection [79]. Leur concentration diminue rapidement au bout de quelques semaines à quelques mois. Chez 90% des patients avec des méningo-encéphalites, les IgM sont détectables dans le sérum et le LCR à partir du 8^{ème} j [80] et dans la majorité des sérums humains les IgM persistent entre 50 à 250 jours [81,82]. Les immunoglobulines M ne traversent pas la barrière hémato-encéphalique, leur présence dans le LCR indique une synthèse intrathécale ou une défaillance dans la BHE ; elle est brève [83].

Les immunoglobulines G (IgG) apparaissent quelques jours après les IgM, généralement 12 à 14 jours après les premiers symptômes [79,83,84]. Leur ascension est lente, atteignent un maximum au 21^{ème} jour et persistent plusieurs années [56,85]. Ces anticorps génèrent une immunité protectrice à long terme

En ce qui concerne la différence entre la réponse immunitaire à médiation humorale suite à une infection par le virus à lignage 1 ou à lignage 2, il a été démontré par des inoculations expérimentales, qu'il n'y a pas de différence lors d'infection par un virus de lignage 1 ou de lignage 2, puisque les sérums d'animaux infectés présentent une activité neutralisante comparable lors d'infection par l'un ou l'autre lignage [86].

Des réactions croisées entre les anticorps dirigés contre le WNV et les autres *Flavivirus* tels que le virus Usutu, le virus d'encéphalite de St. Louis ou le virus d'encéphalite japonaise sont fréquentes, et peuvent être responsables des réactions sérologiques faussement positives attribuées au WNV [87]. L'interprétation des résultats sérologiques lors d'utilisation de l'ELISA peut être délicate. Des tests de confirmation semblent être nécessaires particulièrement en zone de circulation de plusieurs *Flavivirus*, comme l'utilisation des méthodes de référence telle que la séroneutralisation des plages de lyse.

Les lymphocytes T interviennent aussi dans la réponse immunitaire adaptative, surtout par le recrutement des CD8+. Les cellules T cytotoxiques secrètent des cytotoxiques pro inflammatoires [88–90]. Les cellules infectées sont alors lysées sous l'effet de perforines et des granzymes A et B ou via l'interaction Fas-Fas ligand [91,92]. Les lymphocytes T CD4+ contribuent largement au contrôle de l'infection à travers de multiples mécanismes dont la sensibilisation des lymphocytes T CD8+, la production des cytokines, l'activation et la sensibilisation des lymphocytes B, et la cytotoxicité directe.

L'immunité innée joue également un rôle dans la réponse contre le WNV. Les macrophages en plus de leur rôle phagocytaire du WNV, ils peuvent fonctionner comme cellules présentatrices d'Ag, stimulant la prolifération des lymphocytes T anti-WNV [89]. Chez l'homme, les macrophages représentent une fraction importante des infiltrats cellulaires retrouvés dans le système nerveux central suite à une infection à WNV [93].

Les cellules dendritiques jouent aussi le rôle de présentatrices d'Ag, elles transportent le virus jusque dans les ganglions lymphatiques sous contrôle de l'IL-1 β [94,95]. Ces cellules produisent aussi des d'IFN de type-I [96]. La population de lymphocytes T γ/δ augmente de façon significative après infection à WNV [97]. En plus de leur rôle dans la promotion de la réponse adaptative en facilitant la maturation des cellules dendritiques [98], elles produisent des taux importants d'IFN- γ nécessaires pour un contrôle précoce de la dissémination de WNV [99].

Enfin, les polynucléaires neutrophiles sont rapidement recrutés sur le site d'infection, chez la souris, et sont le lieu d'une réplication efficace du WNV [100]. Les PNNs constituent des réservoirs pour la réplication et la dissémination du virus. Les méningo-encéphalites sont souvent associées à une présence de neutrophiles dans le LCR chez l'Homme [101,102].

1.4. Pathogénèse et pathogénie

Les moustiques s'infectent par le WNV après un repas sanguin chez des oiseaux virémiques. Ils peuvent transmettre la maladie à d'autres hôtes vertébrés en prenant un autre repas. Les tiques pourraient également jouer le rôle de maintien de cycle. Les carnivores et reptiles peuvent aussi contaminer la nourriture. La majorité des espèces non aviaires sont des culs de sac épidémiologiques. Cependant, certaines espèces d'écureuils, de tamias, de lapins, de chats, d'alligators et de grenouilles peuvent développer des titres viraux plus élevés. Quelques unes d'entre elles peuvent aussi évacuer le virus via les excréments, leurs sécrétions orales et leurs urines et entraîne une propagation horizontale de la maladie [103].

La période d'incubation est très variée selon l'espèce. Chez l'homme, la période d'incubation est de 2 à 14 jours [84]. La majorité des cas sont asymptomatiques, approximativement 20% développent une fièvre (fièvre du Nil occidental). Un petit nombre des cas progressent à des formes nerveuses graves [104].

Chez les mammifères, les mécanismes exacts et le site de réplication du virus après piqûres d'insectes infectés sont mal connus. Toutefois, on pense que la réplication initiale se produit probablement dans les cellules dendritiques de Langerhans (MHCII+/NLDC145+/E-cadherin+ cells), au niveau de la peau. Ces cellules migrent vers les nœuds lymphatiques et la première virémie est produite. La virémie initiale infecte le système réticulo-endothélial [105]. Selon le niveau de virémie secondaire résultant de la réplication du virus dans le SRE, le WNV infecte les tissus périphériques tels que la rate, le foie et les reins. Cependant, le virus peut pénétrer le système nerveux central. Le mécanisme de pénétration de WNV dans le SNC à travers la barrière hémato-encéphalique demeure en grande partie inconnu [106]. Plusieurs mécanismes de transport du virus au SNC ont été proposés, on vient de les citer dans le paragraphe précédent.

La protéine E assure l'attachement cellulaire et la neuro-invasion. Elle semble être le facteur primaire de virulence [105,107]. Les facteurs de l'hôte qui permettraient l'entrée virale dans le SNC sont mal connus [105]. On a proposé

des facteurs favorisant qui pourraient expliquer l'incidence élevée des méningo-encéphalites chez les personnes âgées, comme l'hypertension et les maladies cérébrales, ou par l'augmentation de la durée de virémie due essentiellement à l'immunodépression. A savoir que la probabilité de la neuro-invasion est susceptible d'être corrélée avec le niveau et la durée de virémie.

Les changements pathologiques dans le SNC sont directement liés aux résultats suivants :

- la prolifération du virus dans les cellules nerveuses et gliales
- L'effet cytotoxique de la réponse immunitaire
- L'inflammation péri vasculaire diffuse
- La formation des nodules micro-gliales [105,108,109]

Le virus cause habituellement une inflammation diffuse dans le thalamus, la moelle épinière et dans d'autres parties du tronc cérébral ainsi que des inflammations péri vasculaires à la partie proximale de la moelle et des nodules microgliales prédominants. Ces nodules sont composés de lymphocytes et ils se trouvent dans des endroits à dégénérescence étendue [110].

1.5. Aspect clinique

1.5.1. Homme

Chez l'homme, il est difficile de prédire avec précision la période d'incubation du virus WN. Cependant, elle est d'environ 2 à 15 jours [84]. La majorité des infections chez cette espèce sont asymptomatiques (80%), alors que 20% des cas présentent un syndrome fébrile. Ce dernier est caractérisé par des maux de tête, des myalgies et arthralgies, nausées et vomissements [111], avec ou sans exanthème (sur les bras, les jambes et le tronc) [112], généralement chez les jeunes patients. Souvent accompagnés de la lymphodénopathie. Cette forme est connue sous le nom de « fièvre de nil occidental » ou « West Nile fever ». Elle dure généralement moins d'une semaine [111]. Des études plus approfondies sur des patients souffrant de WNF ont démontré que la fatigue et la faiblesse durent pendant presque un mois depuis le début des symptômes [112]. D'autres études ont montré que chez certains patients la fièvre et le malaise associés à la perte de poids persistent. La convalescence dure plusieurs jours voire des mois, suggérant que ce syndrome peut être grave [113].

Approximativement, 1% des patients développent la forme nerveuse grave. Au niveau du SNC, la cible primaire du virus est les neurones. La maladie peut alors se présenter sous trois formes : méningite, encéphalite ou sous forme d'une paralysie flasque aiguë [56]. Il est très important de mentionner que le même patient peut présenter les 3 syndromes [58].

Les manifestations extra neurologiques à WNV sont rares. Elles incluent les myocardites, les pancréatites, les hépatites [37,114,115] et une atteinte ophtalmique [116,117].

1.5.2. Oiseaux

Dans les USA, plus de 300 espèces d'oiseaux étaient identifiés sensibles au virus, avec des taux de mortalité élevés chez certaines espèces [118]. La diminution de diverses espèces d'oiseaux a été considérée comme le résultat de l'infection à WNV (exemple de la population de corneilles) [119].

Des autopsies sur des oiseaux morts d'infection naturelle ou expérimentale avec la souche NY99, ont démontré une distribution extensive du virus dans le SNC et dans les organes périphériques avec des titres viraux très élevés. Dans certains cas, la virémie dépasse 10^{10} UFP [120].

Après infection expérimentale réalisée sur la corneille américaine par la souche NY99, les signes cliniques ont été observés 4 jours après inoculation. Plusieurs symptômes tels que la dépression, l'anorexie, l'incapacité au vol et des désordres à la démarche ont été observés. Des saignements par la bouche et le cloaque ont été rapportés. La mort survient 24 heures après [120,121] Les mêmes signes se sont reproduits chez les autres espèces sensibles. Cependant, les moments d'apparition et le résultat de la maladie sont différents (généralement 4-10 jours après inoculation). Il faut signaler que certaines espèces ne montrent aucun signe et particulièrement les espèces appartenant au *Faciformes*, *columbiformes* (pigeons, colombes...) et aux *Anserinformes* (canards, oies...) [118].

Les espèces sensibles présentent des lésions macroscopiques et histopathologiques. On a observé, la congestion du cortex cérébral, la rate (splénomégalie est observée dans plusieurs cas), le cœur et les reins. Des pétéchies au niveau de l'estomac, du foie et des muscles squelettiques; la distension de la vésicule biliaire et l'opacité de sacs d'air ont été aussi rapportées. L'examen histopathologique révèle la présence des hépatocytes nécrosés avec des vacuoles cytoplasmiques, rupture des noyaux et étrange présence des phagocytes mononucléaires dans le tissu. La congestion de la rate et accompagnée par la nécrose de lymphocytes dans ces nœuds lymphatiques ce qui signale la présence d'inflammation cellulaires, en particulier les macrophages du parenchyme splénique. Les fibres des muscles squelettiques sont gonflées avec perte de striation et de fragmentation des sarcomères. On a souvent observé la nécrose de la moelle osseuse [119].

L'isolement du virus est possible dans divers organes des oiseaux symptomatiques ou asymptomatiques. Le virus est isolé de la rate, des reins, du cerveau, du cœur, des poumons et de la trachée de plusieurs espèces. L'isolement est relativement facile dans les plumes et la peau, augmentant la probabilité de transmission au vecteur. Alors que l'isolement du virus dans les ovaires indique une possibilité de transmission verticale [120].

1.6. Diagnostic du laboratoire

1.6.1. Détection virale

1.6.1.1. Isolement du virus

Le virus WN n'est pas facilement isolé des tissus, du sérum et du LCR. Chez les oiseaux, divers prélèvements peuvent être utilisés avec succès tels que le cerveau, le cœur ou le foie [122]. Le virus peut être également isolé à partir des moustiques.

La propagation du virus se fait sur des cultures dérivées des cellules des mammifères ou de lignes de moustiques telles que VERO E6 (cellules de rein de singe vert africain), RK-13 (cellules de rein de lapin), AP61 ou C6/ 36 [123,124]. Cependant, les procédures nécessitent un laboratoire de niveau de sécurité 3

[125]. Lors d'une culture cellulaire, plusieurs passages sont de règle pour pouvoir observer l'effet cytopathique/cytopathogène (ECP) du virus. Généralement, cet effet est observé dans 7 jours [126].

1.6.1.2. Méthodes immunologiques

Immunohistochimie

Le marquage immunohistochimique (IHC) des tissus aviaires après fixation au formol est une méthode fiable pour l'identification de l'infection du WNV chez les oiseaux. Le taux de réussite chez les animaux est augmenté par l'examen de plusieurs organes. Chez l'homme, cette méthode anciennement utilisée pour l'identification du virus dans les tissus obtenus à partir des encéphalites mortelles, aujourd'hui rarement applicables dans des laboratoires et pour juste améliorer la certitude [127].

Les tissus du cerveau et de la moelle épinière des chevaux atteints d'une encéphalite due au virus west nile ne sont pas positifs dans le test IHC ; environ 50% des cas de fièvre de WNV équine donnent des résultats faussement positifs. L'absence d'identification du WNV dans le système nerveux central équin ne permet pas d'exclure la présence de l'infection [127].

1.6.1.3. Méthodes moléculaires

Plusieurs méthodes moléculaires pour la détection de l'ARN viral ont été appliquées pour la surveillance et le diagnostic du WNV. Ces méthodes peuvent être utilisées avec succès dans des échantillons provenant du vecteur, des animaux ou bien de l'homme (sang et/ou LCR ou tissus) [77].

a. PCR en temps réel : (RT PCR)

La RT-PCR reste une technique rapide et fiable de détection d'ARN viral du WNV dans une grande variété d'échantillons (dans plusieurs tissus et chez plusieurs espèces animales) [128]. Cependant, elle représente l'inconvénient d'être assez coûteuse.

Différentes modifications ont été apportées sur la technique durant ces 10 dernières années. On cite à titre d'exemple la TaqMan capable de détecter 0,1 UFP de l'ARN viral [129] mais parfois incapable de détecter des variantes

génomiques émergentes du virus [130]. La technique de SYBR Green est moins chère et plus sensible que la TapMan mais peu spécifique [131]. Un autre inconvénient qu'il faut citer de RT PCR est les courts amplicons obtenus, qui ne sont pas souhaitable pour le séquençage et la caractérisation moléculaire.

La PCR en temps réel est utilisée à grande échelle pour le dépistage du WNV chez l'homme aux USA. Employée essentiellement pour les donneurs de sang et d'organes, depuis 2003, deux tests commerciaux sont disponibles [132]. Taq Screen West Nile (Roche molecular systems) et Proclein West Nile Virus Essay (Gen-Probe INC). La RT-PCR est également employée pour le dépistage et la surveillance du virus chez les moustiques et les oiseaux aux USA [133].

Une PCR multiplex-ligase basée sur l'amplification de 3 régions de génome différentes (une séquence sur NS2 et deux autres sur le gène non-structural NS5) a été développée afin de réduire le risque des faux négatifs dus aux maintes variantes du WNV [134]. Enfin, il est intéressant de mentionner la nouvelle technique de PCR en temps réel quantitative capable de distinguer entre la lignée 1 et 2 du virus [135].

b. Transcription inverse couplée à une PCR (RT-PCR)

La sensibilité de la RT-PCR conventionnelle pour la détection du WNV dépend principalement des séquences ciblées. Un essai basé sur des amorces visant le gène de la protéine C et de prM détecte 0,1 UFP de l'ARN viral a été réalisé [136]. La RT-PCR nichée (RT-nPCR) peut augmenter la sensibilité 10 fois plus qu'une RT-PCR conventionnelle mais ces techniques représentent un risque de contamination élevée (en manipulant des réactifs dangereux tels que le bromure d'éthidium), nécessitent du temps (environ 24 h) et un personnel de laboratoire compétent [136]. Les RT-nPCR visent principalement les régions de 445 et 248 pb du gène codant pour la protéine E du WNV.

Une autre technique de RT-nPCR (pan-specific RT-PCR) est capable d'identifier la plupart des *Flavivirus* [137,138], elle peut aussi différencier entre l'infection à WNV des autres infections à *Flavivirus*. Cependant, aucune indication actuelle au sujet de ces méthodes ne peut être employée pour différencier entre les lignages du WNV.

1.6.1.4. Tests sérologiques

Plusieurs tests sérologiques sont disponibles pour le diagnostic du WNV [139]. Chez les oiseaux, l'ELISA, l'inhibition d'héماغglutination, la neutralisation et enfin la microneutralisation sont les plus couramment utilisés pour l'identification des anticorps anti-WNV. Plusieurs réactions croisées avec des *Flavivirus* apparentés au WNV sont rencontrées, la séroneutralisation sur microplaque est le test le plus spécifique [140]

a. Séroneutralisation

La méthode de référence en sérologie du WN, définie pour la première fois par l'OMS au virus de la dengue puis adaptée au virus du WN [141]. Le principe de ce test est d'inhiber le pouvoir infectieux du virus par des anticorps spécifiques. En présence de ces anticorps, le virus ne peut pas infecter les cellules et le tapis cellulaire reste intact. L'état du tapis est révélé en utilisant un colorant, le crystal violet, qui se fixe sur les cellules, mais pas sur le plastique des plaques (les puits sont colorés si le tapis est intact et il est transparent s'il a été lysé par le virus). Cependant, il est nécessaire de confirmer l'absence d'autres anticorps des *Flavivirus* circulants dans la région d'étude [139].

b. Le test d'inhibition d'agglutination et le test de fixation du complément

Ces deux techniques de nos jours sont rarement employées dans le diagnostic du WNV. Le principe d'inhibition d'agglutination est le pouvoir de la protéine E à agréger les érythrocytes aviaires en absence des anticorps anti-E neutralisants. Cette technique exige un prétraitement des sérums pour enlever des inhibiteurs non spécifiques [87], mais aussi la présence des érythrocytes frais pour un rendement élevé. Elle présente également l'inconvénient d'une spécificité faible. La technique de fixation du complément présente comme inconvénient ses plusieurs étapes et sa faible spécificité et sensibilité [142]. Ces deux tests sont techniquement difficiles, ils nécessitent du temps pour fournir un résultat, et sont relativement peu sensibles. Par conséquent, dans le diagnostic de routine au laboratoire on fait appel à l'ELISA [143] [144].

c. Technique ELISA

Les techniques ELISA sont les plus adaptées dans la routine, en raison de leur rapidité, sensibilité, reproductibilité et abordabilité. Les tests ELISA peuvent être classés en 3 types : ELISA par compétition, ELISA indirect IgG et ELISA capture IgM (MAC-ELISA).

❖ ELISA par compétition

Elle mesure l'habilité des anticorps présents dans le sérum à inhiber la fixation des anticorps monoclonaux à la protéine NS1 [144,145], à la protéine E [144] ou les antigènes spécifiques extraits des cellules infectées par le WNV. L'avantage de cette technique c'est qu'elle est indépendante de l'espèce testée [144,146,147] L'ELISA par compétition basé sur la protéine E détecte les Ac des *Flavivirus* chez plusieurs espèces d'animaux domestiques incluant les chevaux, les bovins, le porc et le chat [144]. Sotelo et collaborateurs (2011) ont développé un ELISA par compétition avec des anticorps monoclonaux reconnaissant le domaine III de la protéine E [148]. Après l'infection expérimentale d'une perdrix, l'ELISA par compétition a détecté les Ac spécifiques 3 jours post-infection. Cependant, ces anticorps ne sont détectables qu'au 10^{ème} jour post-infection par la séroneutralisation. La sensibilité de l'ELISA par compétition est de 100% comparée au test de référence, cependant, la spécificité relative est limitée à 79,5%. Kitai et al ont développé un ELISA par compétition basé sur la protéine non-structurale NS1 dont le pouvoir est de différencier entre les infections à WNV et VEJ dans des sérums de chevaux [145]. L'ELISA par compétition qui utilise la protéine NS1 présente aussi l'avantage de différencier entre les infections naturelles et la vaccination puisque tous les vaccins actuels sont développés à partir de la prM ou de la protéine E.

❖ ELISA capture IgM (ou MAC-ELISA : IgM Antibody-Capture ELISA)

Il permet de déceler les infections aiguës puisqu'il détecte assez tôt les anticorps dans les sérums ou dans le LCR (8 à 45 jours post infection). Le MAC-ELISA utilisé pour la détection des arbovirus [149] est standardisé pour le WNV par CDC à des applications humaines, équine et pour les oiseaux [87]. Ce test standardisé utilise généralement des sérums à des dilutions de 1:400. Il présente

une sensibilité relative de 91,7% et une spécificité relative de 99,2% [150]. Cependant, son utilisation pour révéler des infections récentes chez l'homme est incertaine puisque la persistance des IgM dans certains cas pendant plus d'une année a été rapportée [87].

Le MAC-ELISA reste un test de choix en raison de la difficulté de la détection des IgM par le test de séroneutralisation ou par le test d'inhibition d'agglutination [144] et présente aussi moins de réactions croisées pour la recherche des IgG [83,151]. Cependant, ce test présente des limites d'utilisation par manque de conjugués pour certaines espèces (notamment aviaires) [87].

❖ ELISA capture IgG

Comme le MAC-ELISA, ce test exige l'utilisation des anticorps anti-espèces conjugués adaptés pour chaque espèce. Les IgG sont décelables 2 semaines post-infection et y persistent pendant plusieurs années [140]. Cette technique est largement répandue pour la détermination du statut immunitaire vis-à-vis du WNV dans le sérum ou le LCR chez les animaux suspects ou asymptomatiques, pour des fins épidémiologiques [152]. Cependant, le manque de spécificité de cette approche due aux nombreuses réactions croisées signalées rend la confirmation des résultats en associant ce test à la technique de référence sérologique (séroneutralisation) obligatoire. Les valeurs relatives rapportées de spécificité et de sensibilité des techniques ELISA disponibles sur le marché, sont de 92-93% et 97-98% respectivement [151,153].

1.7. Traitement et prophylaxie

1.7.1. Traitement

1.7.1.1. Chez l'homme

Malgré l'intérêt particulier à développer un traitement spécifique contre le WNV 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 [154] [155].

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 [156].

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* [157]. *In vitro*, le ribavirin à de hautes concentrations empêche la réplication et l'effet cytopathologique du virus west nile dans des cellules nerveuses [158]. 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) [159,160]. La désconcordance des résultats *in vitro* et *in vivo* semble être due à la faible diffusion de la molécule dans le système nerveux central [159]. D'autres essais cliniques sont à exiger avant la commercialisation de la ribavirin [161].

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 WNV a été démontré *in vitro* avec des concentrations aisément réalisable dans le sérum humain [159]. 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 [162].

Les immunoglobulines spécifiques ont montré une efficacité dans le traitement de plusieurs *Flavivirus* [163,164]. Les immunoglobulines ont donné des résultats satisfaisants chez les animaux en particulier chez les souris et les hamsters traités tôt [160,163,165]. 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 [166,167]. Une molécule a été développée par ClinicalTrials.gov nommée NCT00068055 est en phase I d'essai. Les données disponibles restent insuffisantes pour recommander l'utilisation des immunoglobulines contre l'infection à WNV [168].

1.7.1.2. Chez le cheval

Le traitement de l'infection à WNV chez les chevaux reste un traitement symptomatique et de soutien. Aucune thérapie spécifique efficace contre le virus n'est actuellement disponible [169,170]. Les soins de soutien ne s'accompagnent pas toujours de succès [171]. Cependant, des études récentes ont montré l'efficacité des immunoglobulines en IV chez les chevaux présentant des signes cliniques [170].

1.7.2. Vaccination

1.7.2.1. 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 [225]. 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 WNV formant le ChimeriVax-WN01. L'atténuation par mutation en protéine E mène vers le ChimeriVax-WN02 [227]. Ce vaccin est en phase II et montre un pouvoir immunogène élevé et une bonne tolérance lors des essais cliniques [304] [305]. 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 WNV. 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 [306] [307]. 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 [308].

1.7.2.2. Immunité passive

La sérovaccination a été employée pour la prophylaxie passive de nombreuses maladies comprenant le WNV. Plusieurs essais sur des souris ont donné des résultats satisfaisants [172–175]. 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 [176,177].

1.7.2.3. Vaccins vétérinaires

Plusieurs vaccins vétérinaires sont disponibles, leurs propriétés peuvent contribuer au développement de vaccins pour l'homme. Actuellement, il existe 04 vaccins sur le marché contre le WNV destinés aux animaux : 03 avec un virus entier inactivé (WN Innovator™, Vetera™ WNV et Prestige® WNV) et un vaccin à base d'un virus chimérique vivant combinant une partie du WNV (prM/E) avec le virus canarypox (virus de la variole de canari) (Recombiteck™ Equine WNV). Bien que ces vaccins protègent les chevaux, deux doses primaires et un rappel annuel sont nécessaires pour assurer cette protection [178].

Chapitre 2

Epidémiologie du virus West Nile

2.1. Distribution spatiale et temporelle du virus West Nile

Le virus WN a été isolé pour la première fois en 1937 chez une femme fébrile en Ouganda. Depuis l'épidémiologie du WNV est toujours en évolution. La séropositivité du WNV est rapportée en Ouganda, au Soudan, dans l'actuelle RDC et Kenya entre 1939-1940 [179]. La première épidémie est signalée en Israël en 1951 [34], des cas d'infection sont décrits chez les enfants en Egypte toujours dans les années 50 [32], Une autre épidémie éclatée en France en 1960. Entre 1974-1984, des épidémies et des épizooties ont été rapportés en Afrique du Sud [180]. Quelques foyers et des cas sporadiques chez l'homme et les équidés ont été signalés en Albanie, la Bulgarie, Belarusse, Ukraine, Moldavia, Turquie, Iran et en Kenya [181–184].

Jusqu'aux années 90, la maladie chez l'homme était sans grande importance car juste des syndromes fébriles et les complications neurologiques sont rares [16,185]. À partir de 1994, on assiste à la multiplication d'épidémies importantes d'encéphalites à WNV dans le bassin méditerranéen et en Europe [16,186] Son statut peu pathogène est remis en question.

Des épidémies de plusieurs dizaines à centaines de cas sont recensées en Algérie en 1994, en Roumanie en 1996, en Tunisie en 1997, en Russie en 1999 et en Israël en 2000 [17,20,41,187]. 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 [47]. Le virus est étendu progressivement vers le Canada, l'Argentine et le Brésil [188]. Des cas d'encéphalite ont été déclarés en Îles Caraïbes en 2001 et 2003 [189], des anticorps ont été détectés chez les oiseaux et des chevaux en Jamaïque, la République Dominicaine, la Guadeloupe, Porto Rico, le Mexique, Trinidad et Cuba [189].

Dans cette dernière décennie, le WNV continue à causer des problèmes chez l'homme et les équidés. Entre 2009-2013, des cas de maladie du Nil

occidentale ont été enregistrés en Algérie, Bulgarie, Croatie, Grèce, Hongrie, Italie, Kosovo, Monténégro, l'ancienne république Yougoslave de Macédoine, Russie, Serbie, Espagne, Portugal, Croatie et Autriche [190]. En Australie, le virus Kunjin (sous type du WNV lignage 1) circule depuis 1960, en 2011 une épizootie a été déclarée chez les équidés [191].

En 2018, 2647 cas enregistrés aux USA seule et plus de 1600 cas en Europe (avec 124 morts un chiffre multiplié X 7 par rapport à l'année 2017) [192] des chiffres alarmants mettant le WNV parmi les sérieuses menaces en santé publique et animale. La figure (2.1) montre la répartition spatiale de virus à travers le monde.

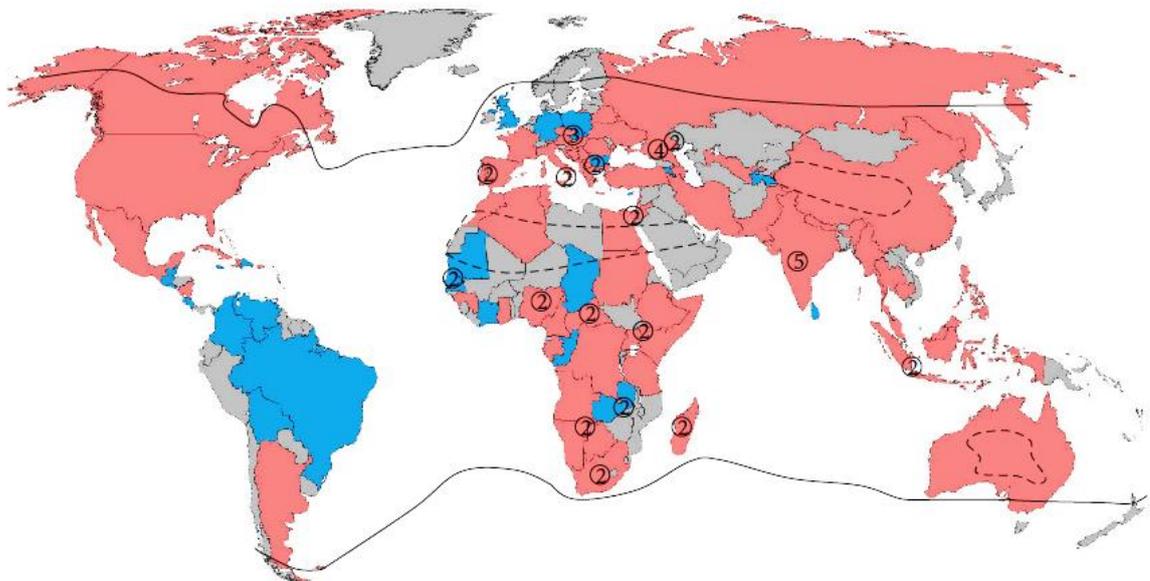


Figure 2.1 : Distribution globale du virus West Nile dans le monde : le rouge – des cas humain ou de séropositivité humaine, bleu – cas non humain/moustique, gris – absence de données ou rapport négatif, la ligne noire – représente la distribution mondiale de vecteur du WNV. Les pays encadrés indiquent la présence de lignages du VNV 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 [193].

2.2. Epidémiologie moléculaire : Phylo-géographie

En se basant sur les analyses phylogénétiques qui s'appuient sur le séquençage de gènes codant pour la protéine E ou NS 5 ou carrément sur le séquençage de génome complet, Neuf lignages du WNV ont été suggérés [194](figure 2.2) dont les deux majeurs lignages (1&2) se divergent dans leurs séquences de 25-30% [180,195]. La maladie causée par le WNV est contribué uniquement au lignage 1 et 2 [168].

Le lignage 1 se distribue en Afrique, Europe, Australie, Asie, l'Amérique du nord et centrale et le Moyen-Orient [196]. Le lignage est subdivisé en 03 clusters (1a, 1b et 1c). le lignage 1a est le plus réponde en Amérique (Souche NY99), en Afrique, Europe et Moyen-Orient, et il était responsable de la majeure partie des épidémies dans ces régions [168]. Parmi les 15 isolats d'Inde entre 1965-1984, 2 sont attribués au 1a [197]. Le lignage 1b, également connue sous le nom du virus Kunjin, a provoqué des épidémies en Australie (épizootie de 2011), au sud-est d'Asie et en Papouasie-Nouvelle-Guinée [198,199]. Le troisième cluster 1c correspond aux virus isolés en Inde [200].

Le lignage 2, se limite initialement au continent africain, où il cause des syndromes fébriles bénignes chez l'homme [196]. Rarement responsable d'épidémies. Cependant, en 2004 et 2005, le virus appartenant à ce lignage a été identifié chez des oiseaux sauvages en Hongrie, rapidement propagé vers l'Europe centrale [201,202]. Des cas aviaires, équins et humains due au lignage 2 ont été rapportés en Russie, la Hongrie, l'Italie et la Grèce [168,203–205]. En 2010, une large épidémie à lignage 2 a été rapportée en Grèce [206].

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 [201,207]. 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 [201]. Ce lignage n'a pas isolé chez l'homme et son potentiel pathogène reste incertain [203]. 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

2.3. Ecologie et cycle de transmission

Le WNV est maintenu dans la nature dans un cycle de transmission enzootique Oiseau-Moustique-Oiseau, les oiseaux hôtes amplificateurs et les moustiques ornithophiles comme des vecteurs [211]. Le genre *Culex* est le plus impliqué dans la transmission du virus à l'homme, 65 espèces de moustiques de 11 genres différents ont été décrites en tant que vecteur compétant aux USA. *Culex pipiens*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. restuans*, *Cx. salinarus*, *Cx. tarsalis* et *Cx. nigripalpus* sont les plus efficaces d'autres espèces telles que *Aedes albopictus*, *Ae. vexcus*, *Orchlerotatus japonicus* et *O. triseriatus* peuvent jouer le rôle vecteur dans le cycle et transmettre le virus aux mammifères [60]. 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 Egypte, Israël et Afrique du Sud, *Cx. annulirostris* en Australie, et *Cx. visbui* et *Cx. tritaeniorhynchus* en Asie [60,103,212]

La transmission verticale est supposée entre les moustiques. La transmission trans-ovarienne naturelle de WNV 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 [213–215]. 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 [216].

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 [103].

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 [217]. Cependant,

l'acquisition de virus durant le repas sanguin n'indique pas nécessairement la compétence vectorielle des arthropodes pour la transmission de virus [56].

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 démontré que *Carios capensis* (tique molle de Goéland) peut transmettre le virus après 35 jours, 10 mois pour *Carios coniceps*, 45 jours pour *Ornithodoros erraticus* [218], 57 à 224 jours pour *Ornithodoros moubata* [219], et 418 jours pour *Argas reflexus* [220].

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 [120,221].

Le cycle oiseaux-tiques est proposé pour expliquer l'infection par le WNV des populations de goélands argentés (*Larus argentatus*) infestés par *C. capensis* dans des îles de la mer Caspienne en absence des moustiques [222]. Le cycle oiseaux-tiques est aussi suspecté en Israël [217]. Enfin, la longue vie des tiques molles pourrait permettre une persistance du WNV de façon localisée dans certains foyers [56].

Les oiseaux sont les réservoirs naturels de WNV. L'infection dans plusieurs espèces d'oiseaux sauvages produit un niveau de virémie suffisant pour infecter le vecteur [223]. 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 WNV [120]. 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 [224].

Beaucoup d'espèces d'oiseaux secrètent des grandes quantités de virus dans leurs excréments et sécrétions orales une fois infectés par le WNV [120], 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) [225].

Bien que la mortalité aviaire élevée n'avait été rapportée qu'à la fin des années 1990 en Israël et en 1999 aux USA [224,226,227]. Cependant, des centaines d'espèces représentant plus de 20 familles sont sensibles [77]. Il est avéré que les espèces les plus sensibles appartiennent aux passériformes, en particulier les corvidés [120].

L'homme, les équidés et autres mammifères sont sensibles à l'infection. L'apparition des cas est liée à une circulation importante du virus dans l'avifaune et la présence des moustiques vecteurs [16]. 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 10^3 UFP/ml [228], insuffisante pour soutenir le cycle.

Plusieurs autres espèces de mammifères 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 [229]. 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 [230,231] 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 [77].

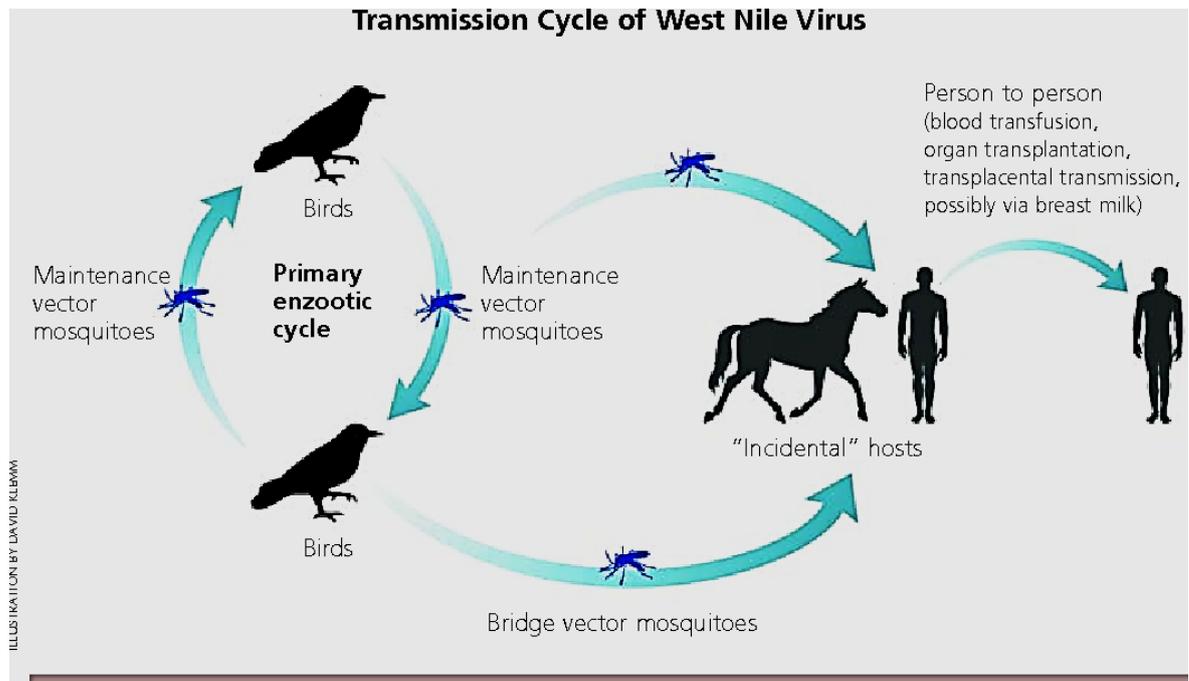


Figure 2.3. Représentation schématique de cycle de transmission du WNV : le virus WN transmet par les moustiques aux oiseaux. L'homme, le cheval et d'autres mammifères et reptiles sont des hôtes accidentels [232]

2.3. Virus West Nile en Algérie

2.3.1. Isolement du WNV

Le WNV a été isolé pour la première fois en Algérie en 1968 à partir d'un broyat constitué de pool de 215 moustiques de genre *Culex*, prélevés dans la région de Djanet, une localité au sud-est de l'Algérie, dans le cadre d'une enquête sur l'épizootie de la peste équine survenue en 1965. L'identification du virus a été effectuée à l'Institut Pasteur de Dakar [233]. Le virus de lignage 1 a été détecté récemment chez le moustique à partir d'un pool de *Culex perexiguus* collecté dans l'oasis d'Aougrout à Timimoune [234]. En Afrique du Nord, le WNV circulant appartient au lignage 1, la souche isolée au Maroc appartient au lignage 1 cluster 1a, similaire à celle isolée au Sénégal [235]. Cependant, la souche isolée en Tunisie appartient aussi au lignage 1 mais semble être plus virulente et proche de la souche NY99 et de celle qui circule en Israël [236].

2.3.2. Surveillance et détection du WNV en Algérie

L'épidémiologie des arbovirus en Algérie est mal étudiée. Les enquêtes et les investigations réalisées dans le cadre du WNV sont espacées dans le temps et l'espace et peu de données sont disponibles sur l'activité de ce *Flavivirus*.

2.3.2.1 Chez l'homme

Le premier rapport en Algérie remonte à 1965, 92 sérums chez les adultes et 175 sérums chez des enfants ont été collectés à Alger et Laghouat respectivement. Les résultats de cette investigation étaient négatifs pour les arbovirus [20]. En 1973, 25 sérums positifs parmi les 171 sérums humains collectés à Djanet [20]. Une autre enquête en 1975 à Illizi à la région de Tamanrasset, sur les 143 échantillons réalisés seulement 5 ont été révélés positifs [20].

La première confirmation de cas cliniques en Algérie est rapportée lors de l'épidémie de 1994 qui a survenue à l'oasis de Tinerkouk [16]. Une cinquantaine de personnes présentent un tableau clinique pourrait être rattachée à la maladie de la fièvre de nil occidentale, 20 patients ont présenté des atteintes céphaliques, parmi ces personnes 8 décès ont été enregistrés. La sérologie pratiquée sur 18

sérums collectés lors de cette épidémie a rapporté une positivité de 83,3% (Tableau 2.1). Cependant le virus n'était pas isolé à l'époque [40].

En 2012, un cas est succombé au WNV à Jijel [20]. Dans la même année 11 sérums ont été positifs à IgG anti-WNV sur les 164 sérums testés dans le cadre d'une enquête rétrospective sur des patients souffrent de méningo-encéphalites à Alger [22]. Entre 2013 et 2014, 2 cas cliniques ont été décrits à Timimoune et Guelma respectivement [237]

2.3.2.2 Chez les animaux

En Algérie, aucun cas clinique chez les animaux n'a été documenté [20]. Malgré que de nombreux rapports aient suggéré l'exposition de plusieurs espèces animales domestiques et sauvages au WNV, peu d'études ont démontré la circulation du virus chez les animaux.

En 1975, une enquête menée dans les oasis de localité de Djanet (Illizi) sur plusieurs espèces animales : des ânes sauvages, des rongeurs et des oiseaux, a rapporté une prévalence de 9,6% chez les ânes, les oiseaux et les rongeurs étaient négatifs [20]. Plus récemment, en 2017 Lafri et al., ont réalisé une étude chez les équidés dans le nord-est de l'Algérie (Skikda, Annaba et El Tarf). Ces derniers ont enregistré une séroprévalence globale de 17,4% [21] (tableau 2.1).

Malgré l'intérêt important de la surveillance de la faune sauvage dans le cas des arbovirus peu d'études dans ce sont ont été réalisés en Algérie.

2.3.3. Système du surveillance du virus West Nile en Algérie

La fièvre WN en Algérie est une maladie à déclaration obligatoire (décrit exécutif n° 95-66 du 22 Ramadhan 1415 correspondant au 22 février 1995 fixant la liste des maladies animales à déclarations obligatoires et les mesures générales qui leurs sont applicables) [364]. Ce qui fait que le système d'épidémiologie-intégrée intègre plus de sept mille vétérinaires praticiens et fonctionnaires convenablement répartis à travers la totalité du territoire national, mais jusqu'à présent sans surveillance active contre cette maladie vectorielle.

Tableau 2.1. Rapport d'enquêtes du surveillance du WNV chez l'homme et les animaux en Algérie[20]

Espèce	Année	Etude	Région	Nbr testés	Résultats
Homme	1965	Bouguermouh 1980	Alger, Laghouat	281	0
	1973	Bouguermouh 1980	Djanet (Illizi)	171	14,6%
	1975	Bouguermouh 1980	Illizi, Tamanrassat	48, 143	58,3%, 3,5%
	1976	Bouguermouh 1980	Ouled Djellal (Biskra)	24	3,5%
	1994	Le Guenno 1996	Timimoune (Adrar)	18	83,3%
	2012	Leparc-Goffart 2012	Jijel	1	100%
	2012	Hachid et al., 2019	Alger	164	6,7%
	2013	Données non-publiées	Timimoune (Adrar)	1	100%
	2014	Données non-publiées	Guelma	1	100%
Rongeur	1975	Bouguermouh 1980	Djanet (Illizi)	19	0
Oiseaux	1975	Bouguermouh 1980	Djanet (Illizi)	188	0
Equidés	1975	Bouguermouh 1980	Djanet (Illizi)	52	9,6%
	2014	Lafri et al., 2017	Skikda, Annaba, El Tarf	293	17,4%

2.4. Rôle des oiseaux dans l'épidémiologie du virus West Nile

2.4.1. Notion des oiseaux compétents

La notion de compétence hôte (host competence) correspond à la capacité d'une espèce hôte à être infectée et à présenter l'agent infectieux à des vecteurs [238]. La compétence d'hôte est évoluée au laboratoire : les vecteurs indemnes de l'infection sont nourris sur des hôtes infectés, naturellement au par injection du virus, et le pourcentage de vecteurs infectés et ensuite évolué [239]. Un index de compétence est calculé indiquant le nombre de vecteurs infectés obtenus à partir d'un oiseau d'une espèce donnée, l'index est calculé de la façon suivante :

$C_i =$ sensibilité des oiseaux \times infectivité journalière moyenne \times durée d'infectivité [120]

Pour le WNV, des valeurs d'index de compétence ont été suggérées pour 25 espèces d'oiseaux infectées expérimentalement avec la souche NY99 [120]. Ces valeurs ont été obtenues en mesurant la sensibilité des oiseaux et la durée de leur virémie. En revanche, l'infectivité journalière moyenne a été extrapolée à partir de données d'infection expérimentale de *Cx. pipiens* obtenue pour différents niveaux de virémie chez le poulet [240] et en considérant que seule une virémie supérieure ou égale à 10^5 PFU/mL est infectieuse. Cependant, cette hypothèse de seuil est controversée [241] et un raisonnement probabiliste est proposé : quel que soit le niveau de virémie, il existe une probabilité que le vecteur s'infecte. La probabilité tend vers zéro pour des virémies faibles et vers un pour des virémies fortes [242].

2.4.2. Oiseaux migrateurs et virus West Nile

Chaque année, des milliards d'oiseaux quittent leurs endroits de reproduction vers des sites d'hivernage à conditions favorables. Plusieurs de ces migrateurs parcourent des distances de quelques kilomètres mais d'autre traversant des distances équivalentes à la circonférence de globe (12). Il existe 8 flux migratoires qui se chevauchent et qui relient les différents continents [243]. Durant leurs longs voyages, les oiseaux véhiculent avec eux des graines de plantes [244], des parasites [245], des bactéries et des virus [4].

La voie de migration Paléarctique relie l'Afrique à l'Europe deux fois par année, et plus de 2,1 milliards d'oiseaux migrent de continent à l'autre pour rejoindre leur site d'hivernage ou de reproduction [3]. L'Algérie occupe une position centrale dans le système de migration du Paléarctique occidental. C'est une vaste zone d'hivernage pour de nombreuses espèces reproductrices eurasiennes et sert également de dernière escale de transit avant de traverser le Sahara pour un grand nombre d'espèces hivernant du Sahel à l'équateur et au-delà en Afrique du Sud [246].

De plus des oiseaux migrateurs sont connus comme des réservoirs du WNV et USUV et la présence de différents lignages et clusters [7] dans le bassin Méditerranéen est attribué au mouvement de l'avifaune sauvage dans des zones où les moustiques et les tiques sont abondants [9]. Les oiseaux migrateurs sont depuis longtemps suspectés dans l'introduction du WNV dans de nouvelles régions pour les raisons suivantes : les foyers du WNV dans les régions tempérés se produisent généralement à la fin de l'été ou au début de l'automne qui coïncident avec l'arrivée de grandes concentrations d'oiseaux migrateurs (et de vecteur) ; les épidémies se produisent souvent chez l'homme vivant dans ou à proximité des zones humides où les oiseaux entre en contact avec un grand nombre de moustiques ornithophiles ; les principaux vecteurs à partir desquels ont été isolés sont principalement ornithophiles les moustiques (*Culex univittatus* au Moyen-Orient et *Cx. pipiens* en Europe) ; les anticorps anti-WNV ont été détectés chez de nombreux espèces d'oiseaux d'Eurasie ; les oiseaux migrateurs ont été incriminés dans le transport de plusieurs virus apparentés du WNV ; la virémie suffisante des oiseaux migrateurs pour infectés les moustiques ; et les stress causé pour le phénomène de migration provoque une immunodépression qui favorisent la réplication du virus chez l'hôte [247].

Le rôle des oiseaux migrateurs dans l'introduction du WNV en Europe et le bassin méditerranéen est évoqué dans de nombreuses études en Espagne [248] [249] [250], Israël [251], Pologne [252], Roumanie [253], République Tchèque [252] et Portugal [254].

2.4.3. L'avifaune en Algérie

En 2000 une synthèse sur l'avifaune algérienne a été publiée dans un important ouvrage signé par ISENMANN et MOALI, dans lequel ils énumèrent les 406 espèces signalées jusqu'en 2000 par les chercheurs, dont 242 espèces non passeriformes et 164 espèces passeriformes. Le nombre d'espèces nicheuses s'élève à 214 (annexes) [246].

Le rôle des oiseaux sauvages dans l'écologie et l'épidémiologie du WNV en Algérie est mal documenté. La surveillance d'avifaune sauvage reste rudimentaire pour les arbovirus en Algérie surtout en absence des cas cliniques et des épidémies d'ampleur dans notre pays.

Chapitre 3

Etude expérimentale

3.1 Matériel et Méthodes

3.1.1. Protocole de l'enquête

3.1.1.1. Problématique et objectifs

Le virus West Nile est le *Flavivirus* le plus répandu dans le monde. Dans le bassin méditerranéen tout comme dans le vieux monde, le virus est considéré comme émergeant et ré-émergeant [16]. Cependant, l'épidémiologie du WNV reste très complexe et cela malgré plusieurs études sur différents aspects épidémiologiques dans le bassin méditerranéen nos connaissances restent limitées et nombreux points sont à éclaircir concernant la circulation et l'apparition des épidémies à WNV dans la région. En Algérie l'isolation du WNV remonte à la fin des années soixante lors d'une enquête sur la peste équine dans la région de Djanet [20]. Dans les années 70, plusieurs enquêtes chez l'homme et les animaux ont mis en évidence la circulation du virus. La première description des signes cliniques chez l'homme a été enregistrée en 1994, la seule épidémie survenue en Algérie [40]. Un cas sporadique en septembre 2012 succombé au virus West Nile à Jijel [20]. Aucun cas n'est documenté chez l'animal dans notre pays malgré que des souches virulentes causent des épidémies périodiquement dans les pays voisins à savoir la Tunisie (2003, 2007, 2010, 2011, 2012 [19]) et le Maroc (2011) [19].

L'Algérie constitue aussi une escale de choix dans les voies de migrations des oiseaux sauvages reliant l'Europe et l'Afrique [246]. Deux fois par années, l'avifaune migratrice hôte compétent du WNV se rencontre avec des moustiques compétents en particulier dans des zones humides où des vecteurs sont en abondance, facilitant l'amplification et la transmission de ce virus. Le système de surveillance actif d'introduction du WNV via les oiseaux migrateurs et l'amplification locale par les biais de l'avifaune sédentaire en Algérie est précaire ou carrément absent. Par conséquent, le rôle joué par les oiseaux sauvages

dans l'écologie et l'épidémiologie du WNV est encore mal connu en Algérie. Notre travail est destiné à mettre le point sur la situation actuelle du WNV chez certaines espaces d'oiseaux en Algérie avec pour objectifs :

- Evaluer la situation épidémiologique du WNV chez l'avifaune sauvage dans certaines zones à risque algériennes.
- Etudier le rôle des oiseaux migrateurs dans l'introduction et la propagation du virus le long de leur itinéraire migratoire.
- Quantifier la circulation sylvatique locale et le risque d'apparition d'épidémies.

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

- Quelle est la prévalence réelle du WNV dans les populations d'oiseaux sauvages en Algérie ?
- Les espèces migratrices peuvent-elles jouer un rôle dans l'introduction de nouvelles souches virulentes et dans la modification de l'épidémiologie du ce virus et par conséquent dans l'apparition des épidémies à WNV ?
- Enfin, quelles sont les espèces qui interviennent dans la circulation et le maintien du WNV dans la nature en Algérie ?

3.1.1.2. Localisation de la zone d'étude

Les échantillons ont été collectés en Kabylie, une région située dans le nord de l'Algérie à l'est de la capitale. Elle est caractérisée par écosystème riche s'étend sur une superficie de 31 609 Km². Les sites de capture se focalisent dans trois wilayas à savoir : Tizi-Ouzou (36°43'00"N 4°03'00"E), Béjaïa (36°45'00"N 5°04'00"E) et Bouira (36°22'00"N 3°53'00"E) (figure 3.1).

La Kabylie est région montagneuse se distingue par son climat méditerranéen avec une pluviométrie entre 600 ml- 1000 ml /an et une température moyenne de 18° C sur le littoral et 25° C dans l'intérieur des wilayas. L'agriculture, en particulier l'arboriculture est l'activité principale de la région.

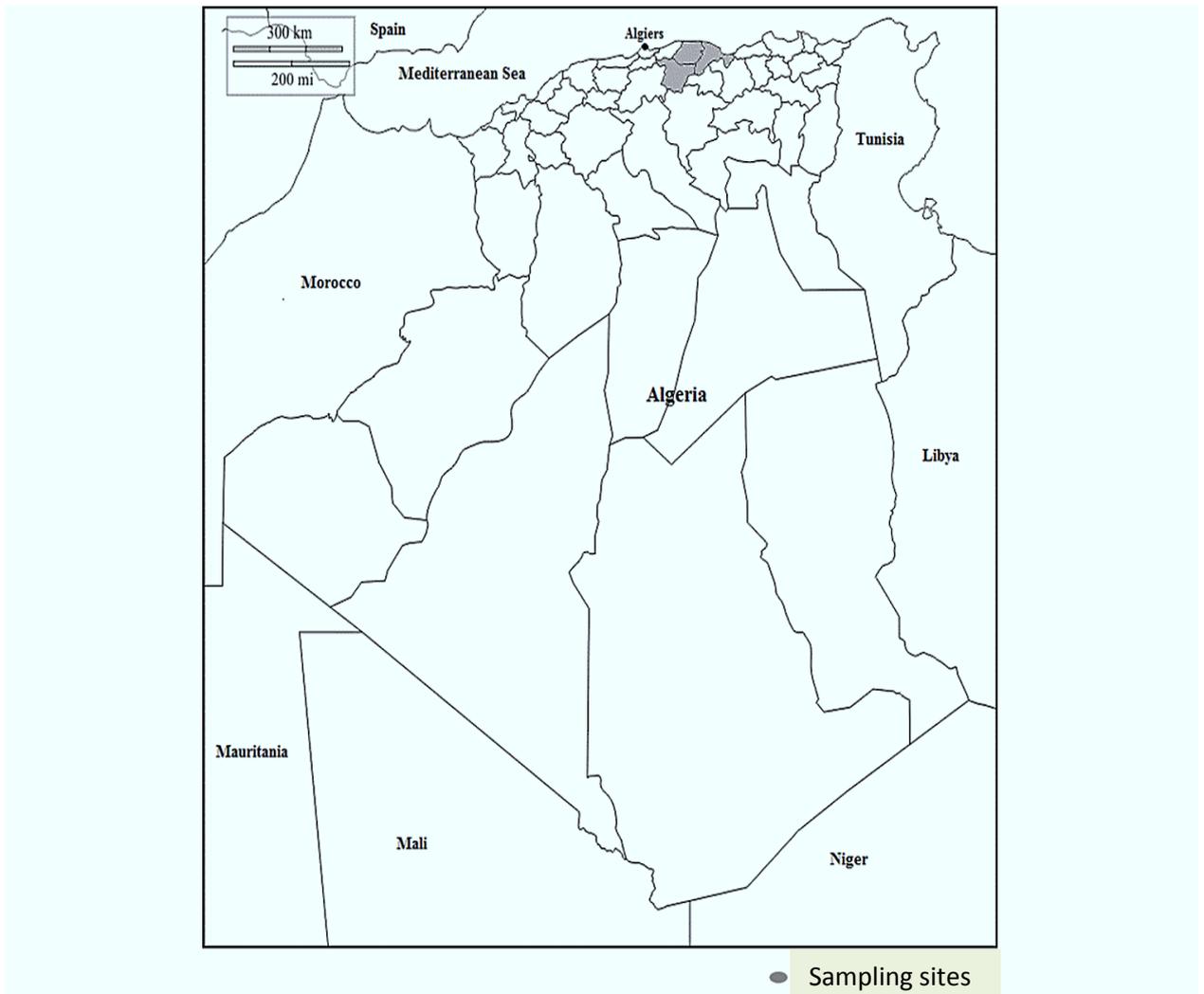


Figure 3.1. Localisation de la région d'étude

3.1.1.3. Population d'études

3.1.1.3.1. Les espèces migratrices

La population d'étude est constituée de deux espèces migratrices à savoir la grive musicienne (*Turdus philomelos*) et l'étourneau sansonnet (*Sturnus vulgaris*)

La grive musicienne ou *Turdus philomelos* une espèce qui appartient à la famille des turdidés, un passereau commun et répondu. On distingue trois sous-espèces : *T. p. philomelos*, *T.p. clarkei* et *T.p. herbridensis* [255]. La grive musicienne occupe une grande diversité d'habitats boisés. Les populations les plus nordiques de cette espèce notamment les oiseaux de la première année

passent l'hiver en Îles canaries, Maroc, Algérie, Tunisie, Lybie et chypre. De nombreux oiseaux de cette espèce originaires de Grande-Bretagne et d'Irlande hivernent probablement en Algérie.

Etourneau sansonnet ou *Sturnus vulgaris* est l'une des 114 espèces appartenant à la famille des sturnidés. Elle est l'un des passereaux les plus communs en Europe. Cette espèce se caractérise par un plumage nuptial noir à reflets violets et vert (bec jaune), finement tacheté de blanc et de beige en hiver [255]. En automne, les populations nord-européennes et est-européennes migrent depuis des zones de reproduction en direction du sud et du sud-ouest et l'ouest soit vers l'ouest d'Europe ou à l'Afrique du Nord [256]

La restriction de notre étude à deux espèces migratrice de la famille des turdidés et de sturnidés est justifiée par le fait que :

- (1) Ces deux espèces arrivent simultanément et d'une façon massive.
- (2) Faciles à capturer en grand nombre comparée aux autres oiseaux migrants, candidat à l'introduction du virus.
- (3) Le rôle primordial des passereaux dans la circulation du virus west Nile [391].
- (4) Les moyens financiers qui ne permettent pas d'élargir le champ de l'enquête.



Figure 3.2. La grive (*Turdus philomelos*) photos personnelles (2016)

3.1.1.3.2. Les espèces sédentaires

Deux espèces sédentaires et péri-domestiques (fréquentes à proximité des habitations) ont été choisies parmi la liste des oiseaux amplificateurs jouant un rôle clé dans l'émergence du virus West Nile : le moineau domestique « *Passer domesticus* » et le pigeon domestique « *Columbia livia* ».

Le moineau ou *Passer domesticus* espèce appartient à la famille des *passiridae*, oiseau familier, très commun et largement répandu. Il vit très près de l'homme dans des zones rurales et urbaines. Cette espèce nidifie sur les bâtiments, les conduits d'air et parfois sur des arbres [255].

Le choix du moineau est basé sur :

- (1) Le rôle particulier de cette espèce dans le cycle de transmission du WNV [120].
- (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.

Le pigeon domestique ou *Columbia livia* est une espèce qui appartient à la famille des *Columbidae*. Le pigeon biset comporte le pigeon domestique et d'autres espèces sauvages. L'adulte mesure de 29 à 37 cm. La tête, le cou et la poitrine sont d'un gris –bleuâtre sombre auquel s'ajoute une iridescence brillante jaunâtre, verdâtre et rougeâtre le long du cou et des plumes couvrant les ailes [255].

Le choix du pigeon est basé sur :

- (1) Une espèce abondante facile à capturer et prélever
- (2) Malgré leur faible virémie [257] les pigeons sont de bons indicateurs épidémiologiques et ils peuvent jouer un rôle dans la surveillance des arbovirus.



Figure 3.3. Le moineau "*Passer domesticus*" (Photo personnelle 2018)

3.1.1.4. Définition du cas

Dans cette étude, un individu est considéré comme positif aux flavivirus, si son sérum analysé par ELISA compétition IgG-WNV (Kit commercial) se montre positif. Un sérum est considéré comme positif si le pourcentage d'inhibition du puits correspondant est supérieur à 30% [258].

La confirmation se fait par la séroneutralisation en microplaque, test de référence du WNV. Les sérums ont été testés aussi pour le virus Usutu.

3.1.1.5. L'échantillonnage

Pour pouvoir détecter une séroprévalence minimale de 3%, un minimum de 98 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 98 pour une prévalence limite de 3% et un risque d'erreur de 5%.

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

$$n = \frac{\ln \alpha}{\ln(1 - P)}$$

$$n = \frac{\ln 0,05}{\ln(1 - 0,03)} = 98$$

3.1.1.5.1. La capture

- Ethique et autorisation de capture

La permission de capture, de manipulation et de prélèvements des oiseaux sauvages est obtenue par le comité d'éthique de la Direction Générale des Forêts de ministère d'agriculture, du développement rural et de la pêche (annexes).

- Méthode de capture

Les oiseaux ont été capturés par deux méthodes le long de notre étude : soit à l'aide de filets japonais soit par des petits pièges à ressort (pièges traditionnels).



Figure 3.4. Filets japonais placé pour la grive (photo personnelles 2016)



Figure 3.5. Filets japonais placé près d'habitation pour le moineau et les pigeons (photos personnelles 2016).



Figure 3.6. Pièges traditionnels (photos personnelles 2016).

- Période de capture

Les oiseaux migrateurs : les captures ont eu lieu durant la période de chasse de ces deux espèces qui passent l'hiver en Algérie c'est-à-dire entre fin novembre et fin janvier. La capture de la grive et des étourneaux a été réalisée en 2014-2015 et 2016-2017.

L'avifaune sédentaire : les captures ont lieu de septembre à février des années 2014-2015 et de 2016-2017.

- Identification des animaux et traitement des prélèvements

• Identification des espèces et détermination de sexe et de l'âge

Les espèces d'oiseaux ont été identifiées en se basant sur des critères morphologiques (The most complete guide to the birds of Britain and Europe [255]). Seul le sexe des moineaux est déterminé par observation extérieure. Le mâle porte une large bavette (absente chez la femelle) sur la gorge et la poitrine. Le dessus de la tête est gris cendré, le ventre grisâtre et le dos brun marron chocolat. La femelle se distingue du mâle par son plumage beaucoup plus terne, un sourcil crème derrière l'œil, absence de bavette et le dos est marron sans teinte chocolat [259].

• Méthode de prélèvement

Le sang est prélevé dans des tubes secs et identifié individuellement après sacrifice des sujets pour les petites espèces. La quantité de sang recueillie est

conditionnée par la taille de l'espèce. Pour la grive et l'étourneau le volume du sang varie entre 2 et 2,5 ml alors que pour le moineau 1 à 2 ml de sang ont été prélevés. Pour le pigeon, le sang est prélevé au niveau de la veine alaire à l'aide d'un épicrotarien à aiguille fine. 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 l'analyse.



Figure 3.7. Prélèvement du sang sur des tubes secs (photo personnelle 2016)



Figure 3.8. Sérum conservé dans l'Eppendorf (photo personnelle 2016).

3.1.1.6. Analyses du laboratoire

Une partie des analyses du laboratoire a été réalisée à l'ANSES, URM 1161 virologie (France), une autre partie a été assurée au niveau de LBRA (Laboratoire des Biotechnologies liées à la Reproduction Animale) de l'université Blida 1.

Dans une première étape, les sérums des oiseaux ont été testés par la technique ELISA de type compétition, le kit « ID Screen West Nile compétition » a été utilisé. En second lieu, les sérums positifs ont subi un test de confirmation par séroneutralisation sur microplaque.

3.1.1.6.1 ELISA compétition

3.1.1.6.1.1. Principe

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

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

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

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

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

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

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

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

Où S : densité optique (DO) du sérum testé sur Ag WN,

BF : bruit de fond correspondant, ST_i : DO des sérums témoins testés sur Ag-WN

BF_i : bruit de fond des sérums témoins.

Un sérum est considéré positif si le pourcentage d'inhibition du puits correspondant est supérieur à 30% [258] ou 45% [260] selon les auteurs.

3.1.1.6.1.2. 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 Competition » 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%.

3.1.1.6.1.3. Objectifs et domaines d'application

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

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

3.1.1.6.1.4 Appareillage et matériels

- micropipettes, monocanales et multicanales, 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 °C ($\pm 3^\circ\text{C}$).

3.1.1.6.1.5 Réactifs et produits

3.1.1.6.1.5.1 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

3.1.1.6.1.5.2 CONDITIONS DE CONSERVATION

À la réception et jusqu'à l'ouverture, la trousse commerciale « ID-Screen West Nile Competition » doit être entreposée à + 5 °C (\pm 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 (\pm 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 (\pm 3 °C).

3.1.1.6.1.5.3 PRECAUTIONS

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

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

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

3.1.1.6.1.5.4 PREPARATION DE LA SOLUTION DE LAVAGE

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

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

3.1.1.6.1.6 Préparation des échantillons

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

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

Plan de Plaque :



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C(+)-1	Echantillon 4	Echantillon 12	Echantillon 20	Echantillon 28	Echantillon 36	Echantillon 44	Echantillon 52	Echantillon 60	Echantillon 68	Echantillon 76	Echantillon 84
B	C(+)-2	Echantillon 5	Echantillon 13	Echantillon 21	Echantillon 29	Echantillon 37	Echantillon 45	Echantillon 53	Echantillon 61	Echantillon 69	Echantillon 77	Echantillon 85
C	C(-)-1	Echantillon 6	Echantillon 14	Echantillon 22	Echantillon 30	Echantillon 38	Echantillon 46	Echantillon 54	Echantillon 62	Echantillon 70	Echantillon 78	Echantillon 86
D	C(-)-2	Echantillon 7	Echantillon 15	Echantillon 23	Echantillon 31	Echantillon 39	Echantillon 47	Echantillon 55	Echantillon 63	Echantillon 71	Echantillon 79	Echantillon 87
E	T+ interne compétWN	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

3.1.1.6.1.7 Mode opératoire

3.1.1.6.1.7.1 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.

3.1.1.6.1.7.2 INCUBATION

- incuber pendant 90 min (± 6 min) à température ambiante du laboratoire 21°C ($\pm 5^\circ\text{C}$).

3.1.1.6.1.7.3 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.

3.1.1.6.1.7.4 ETAPE DU CONJUGUE

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

3.1.1.6.1.7.5 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 ($\pm 5^\circ\text{C}$), 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).

-

3.1.1.6.1.8 Expression des résultats

3.1.1.6.1.8.1 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 :

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

3.1.1.6.1.8.2 VALIDATION DU TEST

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

- la valeur de DO_{CN} doit être supérieure à 0,700 (**$DO_{CN} > 0,700$**)
- le rapport de la moyenne des contrôles positifs sur la moyenne des contrôles négatifs doit être inférieur à 0,3 (**$DO_{CP} / DO_{CN} < 0,3$**)
- le coefficient de variation (CV) des contrôles négatifs doit être inférieur à 10% (**$CV_{CN} < 10\%$**)

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 $10 \leq CV_{CN} \leq 20\%$, 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.

3.1.1.6.1.8.3 EXPRESSION DES RESULTATS

- $\% \text{ S/N} \leq 40$: échantillon positif
- $40 < \% \text{ S/N} \leq 50$: échantillon douteux

- % S/N > 50 : échantillon négatif

Un échantillon donnant un %S/N proche des seuils de positivité ou de négativité définis ci-dessus, avec un statut (positif, négatif ou douteux) qui varie lorsque l'incertitude de l'essai « ID-Screen West Nile Competition » 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 Competition.

Les échantillons douteux et positifs nécessitant une confirmation seront soumis à un nouvel ELISA « ID-Screen West Nile Competition » : 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.

3.1.1.6.2 Séroneutralisation sur microplaque

3.1.1.6.2.1 Objet et domaine d'application

Ce mode opératoire décrit le titrage des anticorps spécifiques du virus West Nile par la méthode de référence de séroneutralisation.

3.1.1.6.2.2 Hygiène et sécurité

Respecter les procédures de gestion des déchets à risque infectieux. Travail en zone confinée de niveau 3 (utilisation de virus West Nile infectieux).

3.1.1.6.2.3 Principe de la méthode

Nous apprécierons les effets cytopathogènes (ECP) induits après contact des cellules Vero NK avec le virus West Nile selon la technique permettant l'observation des cellules infectées et réfringentes en plaque 96 puits. Si des anticorps spécifiques du virus West Nile sont présents dans le sérum testé et à la dilution évaluée, ils pourront neutraliser les particules virales et empêcher l'apparition d'effets cytopathiques.

3.1.1.6.2.4 Matériels nécessaires

- Micropipettes et cônes à filtre
- Pipettes stériles
- Microscope
- Étuve à CO₂, 37°C, 5% CO₂
- Plaques de culture 96 puits
- Pipette multicanaux 50-300µL

3.1.1.6.2.5 Réactifs (chimiques et biologiques)

- Cellules VeroNK (fournies par P. Desprès)
- DMEM 4,5g/L glucose (InVitrogen)
- Milieu de culture : DMEM + 5% SVF (Lonza) + 1% pyruvate de sodium + 1% pénicilline/streptomycine (InVitrogen)
- Virus West Nile, souche IS-98-ST1 : produite sur cellules d'insecte AP61 (fourni par P. Desprès).

Un stock viral réservé à la séroneutralisation a été produit après un passage sur cellules VeroNK : infection de boîtes 10cm de cellules VeroNK (boîtes de 2j,ensemencées avec 1/20 des cellules d'une flask 75cm² à confluence), après 2 lavages en DMEM, avec 1,5mL de DMEM+4µL de surnageant viral AP61 pendant 2-3h à 37°C sous agitation, puis ajout de 8,5mL de milieu complet de culture. Récolte du surnageant cellulaire 3 et 5 jours post-infection et aliquotage (12/2007).

Titre du stock « 0,4µL surnageant viral » 3J : 10⁷ DECP₅₀/mL. Ce virus sera dilué au 1/5000 (suspension virale à 2x10³ DECP₅₀/mL) avant utilisation.

- Virus West Nile, souche France00 : surnageant Pasteur produit le 16/10/09 (fourni par M. Grandadam).

Un stock viral a été produit après un passage sur cellules VeroNK : infection de flasks 75cm² de cellules VeroNK (boîtes d'1j), après 2 lavages en DMEM, avec 40 et 200µL de surnageant viral pendant 1h30-2h à 37°C sous agitation, puis ajout de 15mL de milieu complet de culture. Récolte du surnageant cellulaire 4 jours post-infection et aliquotage (12-16/03/2010).

Titre du stock B (200µL surnageant Pasteur) : 10^{6,8} DECP₅₀/mL. Ce virus sera dilué au 1/5000 (suspension virale à 2x10³ DECP₅₀/mL) avant utilisation.

- Echantillons de sérums animaux. Sérums positifs et négatifs. Décomplémenter les sérums à 56°C pendant 30 minutes.

3.1.1.6.2.6 Contenu du mode opératoire

Diluer les sérums de pie au 1/5 avec du DMEM sans additifs dans un tube eppendorf de 1,5ml.

Effectuer la décomplémentation.

Dilution des sérums en plaque (dilution en série d'un facteur 2, de 1/5 au 1/320) : déposer 50µL de DMEM dans toutes les cupules d'une plaque 96 puits à l'exception de la première ligne où vous déposez 100 µL des sérums décomplémenté et des colonnes 11 et 12 (réservées au titrage de la suspension virale).

Réaliser des dilutions en série des sérums par colonne (lignes B à G), en ajoutant 50µL de la ligne précédente aux 50µL de DMEM déjà présents (jeter 50µL du milieu des cupules G après dilution).

Les cupules de H1 à H5 servent de cupules témoin sans virus (témoin cellule) et contiennent 100µL de DMEM. Les cupules de H6 à H10 servent de cupules témoin virus (sans sérum) et contiennent 50µL de DMEM seul.

Schéma de plaque

Titration de la
suspension virale
(1 ou 2 par série)

Sérum 1	Sérum 2	Sérum 3	Sérum 4	Sérum 5		
1/5						10 ⁻ 10 ⁻
1/1						10 ⁻ 10 ⁻
1/2						10 ⁻ 10 ⁻
1/4						10 ⁻ 10 ⁻
1/8						10 ⁻ 10 ⁻
1/1						10 ⁻ 10 ⁻
1/3						10 ⁻ 10 ⁻
	T- cellules		T- Virus sans sérum			10 ⁻ 10 ⁻

Ajout du virus : Préparer une suspension contenant 100 DECP₅₀/50µL et ajouter 50µL de cette suspension dans toutes les cupules des colonnes 1 à 10.

Cupules « Titration du virus » : diluer la suspension virale au 1/10, 1/100, 1/1.000 et 1/10.000, en déposant 198µL de DMEM dans les cupules A11, A12, E11, E12 et en ajoutant 22µL de la dilution précédente. Répartir 50µL de chaque dilution dans 4 cupules. Ajouter 50µL de DMEM dans les 16 cupules servant au titrage.

Placer les plaques à l'étuve à 37°C pendant 1h30.

Ajout des cellules VeronK : Trypsiner une boîte de 75 cm² et resuspendre les cellules dans 10 ml de milieu DMEM complet. Réaliser un comptage cellulaire sur une dilution au 1/10 de la suspension cellulaire et préparer une suspension cellulaire à 2x10⁵ cellules/mL. Ajouter 100µL de cette suspension à toutes les cupules.

Placer les plaques 96 puits à l'étuve à 37°C pendant 3 jours.

Lecture au microscope : noter les cupules qui présentent un ECP au bout de 3 jours (cellules arrondies et réfringentes).

3.1.1.7. Etude statistique

Les résultats des tests sérologiques ont été traités sous forme de tableaux et les intervalles de confiance bilatéraux à 95% autour des fréquences sont calculés à l'aide de logiciel Excel[®] Microsoft[®] version 2010. La comparaison des pourcentages a été effectuée par le test de Chi2 ou le test exact de Fisher en utilisant le logiciel Statistica (StatSoft[®]) version 6. Une différence est significative si la valeur de p est inférieure à 0,05.

Le calcul des intervalles de confiance bilatéraux autour des fréquences sera réalisé si les conditions du test sont remplies, à savoir : $np > 5$, $n(1-p) > 5$ et $n > 30$, avec n : effectifs des échantillon p : la fréquence observée. Le calcul de l'intervalle de confiance à 95% sera effectué par la formule suivante :

$$IC = P \pm Z_{\alpha} \sqrt{P(1-P)/n}$$

Avec P est la fréquence observée, n est l'effectif de l'échantillon, le risque α est fixé à 5%, $Z_{\alpha} = 1.96$.

3.2. Résultats

3.2.1. Bilan de capture

2014-2015 : 210 oiseaux ont été capturés durant la période de piégeage, ces animaux ont été identifiés, sexés lorsque si possible et prélevés selon un protocole déjà cité en matériel et méthodes.

2016-2017 : 87 oiseaux ont fait l'objet de capture, d'identification et de prélèvement.

3.2.2. Composition de l'échantillon

a. Etude d'espèce ration

Sur les 297 oiseaux capturés, 99 spécimens appartiennent à la famille des turdidés (grive), 47 échantillons sont des étourneaux, 111 moineaux et enfin 40 prélèvements ont été réalisés chez des columbidés (pigeons domestiques).

Tableau 3.2.1. Structure de la population d'étude

Espèce	Année de la capture	Nombre
<i>Turdus philomelos</i>	2014-2015	99
<i>Passer domesticus</i>	2014-2015	111
<i>Sturnus vulgaris</i>	2016-2017	47
<i>Columbia livia</i>	2016-2017	40

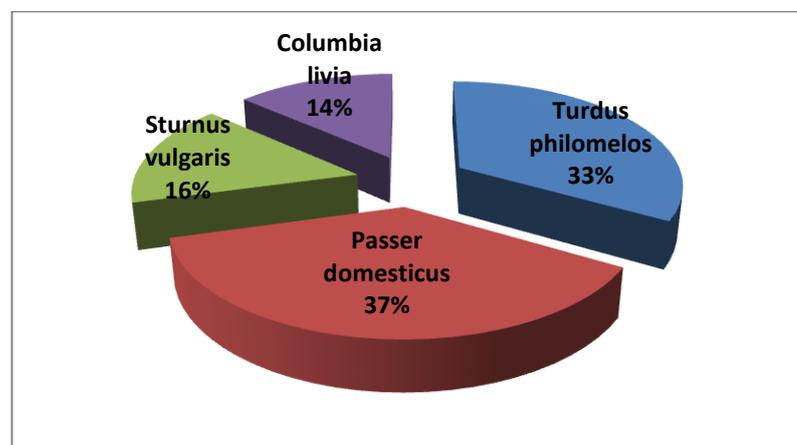


Figure 3.2.1. Espèce ration de la population d'étude

c. Etude sexe ration

Vue la difficulté de faire le sexage des oiseaux, on s'est contenté de sexer seuls les moineaux. Sur 111 moineaux capturés, 50 sont des mâles et 61 sont des femelles, ce qui donne un sexe ratio de 0,819 m/f.

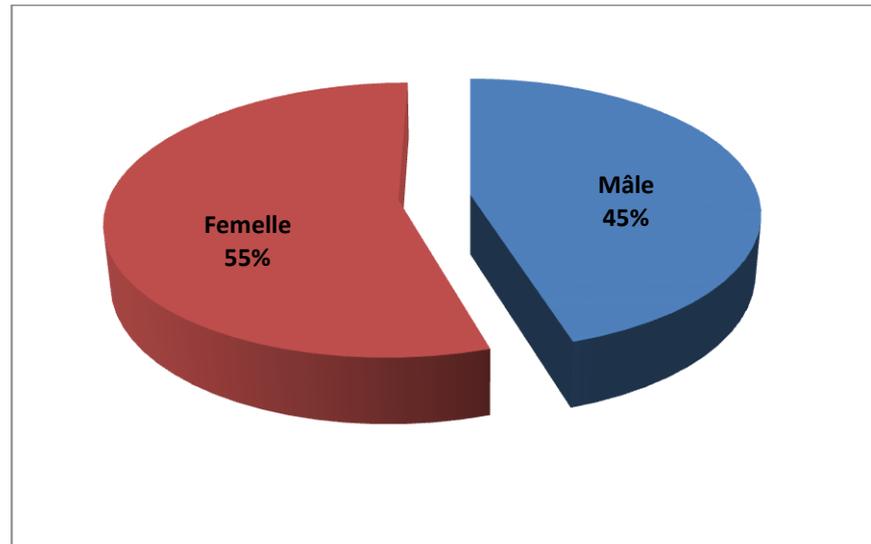


Figure 3.2.2. Sexe ration des moineaux

d. Distribution de population selon le site de capture

La répartition des espèces selon la wilaya est représentée dans le tableau ci-dessous.

Tableau 3.2.2 : Distribution des oiseaux selon le site de capture

wilaya \ espèce	Grive	Moineau	Etourneau	Pigeon
Tizi-Ouzou	71	50	21	21
Bejaia	28	35	-	-
Bouira	-	26	26	19

3.2.3. Résultats de la sérologie

3.2.3.1. Résultats de l'ELISA

Seulement 241 prélèvements ont été testés par l'ELISA, les autres prélèvements n'avaient pas assez de volume pour faire à la fois les tests ELISA et la SNT. Par conséquent, nous avons préféré les garder pour faire la SNT uniquement.

3.2.3.1.1. Séroprévalence globale

Sur les 241 sérums d'oiseaux testés par la technique ELISA de type compétition capture IgG anti- *Flavivirus*, 20 oiseaux se sont montrés séropositifs au test ($S/N \% \leq 40$) ce qui correspond à une séropositivité de 8,3% (20/241) pour la population testée (Indice de confiance à 95% : [4,9%-11,7%]). Le tableau et la figure reprennent la séroprévalence globale ainsi que l'intervalle de confiance à 95%.

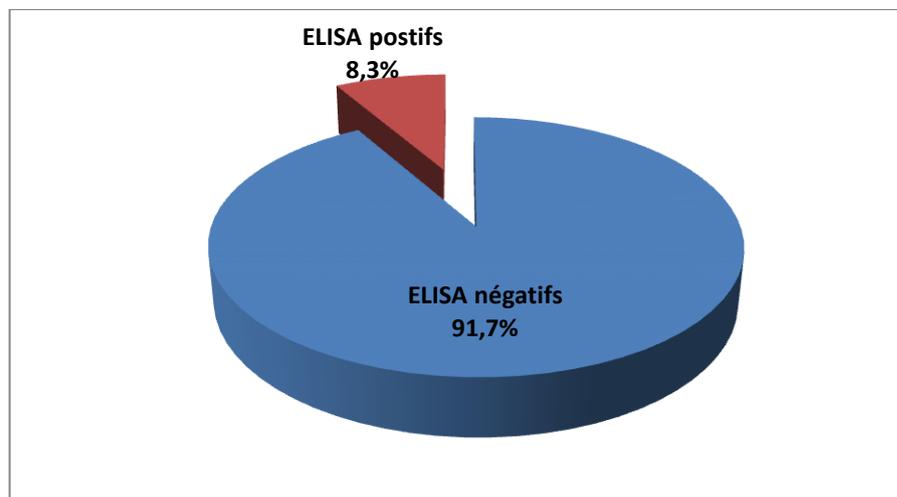


Figure 3.2.3. Séroprévalence globale par ELISA

Tableau 3.2.3 : Résultat globale de sérologie par ELISA par compétition

Effectifs	N° de séropositifs	Prévalence	IC à 95%
241	20	8,3%	[4,9-11,7]

3.2.3.1.2. Séropositivité en fonction de l'espèce

Parmi les 20 oiseaux séropositifs, 75 % sont des oiseaux migrateurs (15/20) avec 12 et 3 oiseaux positifs pour la grive et l'étourneau respectivement ; et 25 % sont des oiseaux sédentaires (5/20) avec 1 moineau et 4 pigeons. L'espèce dans cette étude ne semblait pas être un facteur de risque d'infection par les *Flavivirus* (p value=0,053491). (Figure 3.2.6).

Le tableau de contingence reprend la relation entre l'espèce de l'avifaune sauvage et la séropositivité au test ELISA par compétition

Tableau 3.2.4 : Séropositivité selon l'espèce par la technique ELISA type compétition

	La grive	L'étourneau	Moineau	Pigeon	Total
Positif	12	3	1	4	20
Négatifs	76	44	65	36	221
Total	88	47	66	40	241
Séro(+)	13,6%	6,3%	1,5%	10%	8,3%
IC à 95%	[6,5-19,7]	[0-13,2]	[0-4,5]	[0,8-19,2]	[4,9-11,7]

Aucune relation statistiquement significative entre l'espèce et l'infection au *Flavivirus* (p-value=0,05349). Le caractère « Espèce » n'est pas un facteur du risque lié à la séropositivité chez les oiseaux dans notre étude.

3.2.3.1.3. Séropositivité en fonction de région de capture

Sur les 20 oiseaux révélés positifs à l'ELISA, 16 sont capturés à la wilaya de Tizi-Ouzou (avec 10 grives, 1 moineau, 2 étourneaux et 3 pigeons) c'est-à-dire 80% (16/20) des oiseaux séropositifs à la première technique. A Bejaia, on a enregistré 2 sérums positifs (2 grives) ce que représente 10% de oiseaux positifs et enfin on a signalé le même taux à Bouira 10% (2/20, 1 étourneau, 1 pigeon). Il semblait que la wilaya de Tizi-Ouzou est la plus touchée.

Les résultats de la séropositivité en fonction de la wilaya où les oiseaux ont été capturés sont rapportés dans le tableau et la figure suivants :

Tableau 3.2.5 : Séropositivité des oiseaux en fonction de la wilaya

	Grive	Etourneau	Moineau	Pigeon	Taux	%
Tizi-Ouzou	10/61	2/21	1/30	3/21	16/133	[6,53-17,53]
Bejaia	2/27	-	0/21	-	2/48	[0-9,7]
Bouira	-	1/26	0/15	1/19	2/60	[0-7,8]
Total	12/88	3/47	1/66	4/40	20/241	[4,9-11,7]

La valeur p (p-value=0,03989) permet de conclure, pour notre étude, la présence d'un lien statistiquement significatif entre la séroprévalence des espèces et l'endroit du capture. Il semblait que dans cette enquête le lieu de capture influence sur la séropositivité des espèces au *Flavivirus*.

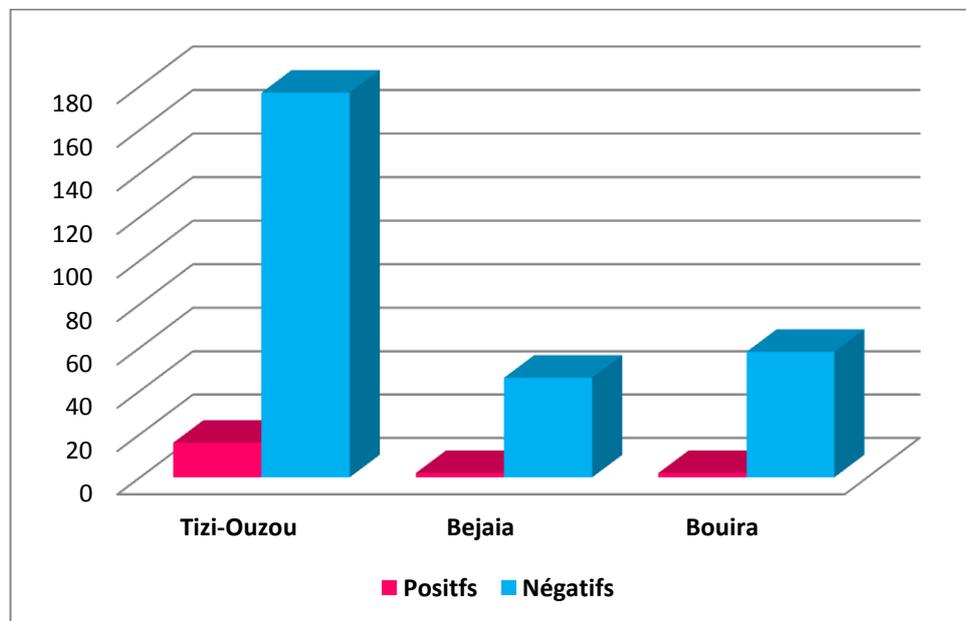


Figure 3.2.4. Séropositivité en fonction de site de capture

3.2.3.1.4. Séropositivité en fonction de sexe

Seuls les moineaux sont sexés en se basant sur des critères morphologiques externes, sur les 66 moineaux testés, 27 sont des mâles et 39 sont des femelles. Un seul mâle s'est révélé séropositif à l'ELISA IgG anti-*Flavivirus*.

Tableau 3.2.6 : Séropositivité en fonction du sexe des moineaux

	Effectifs	Séropositifs	Séronégatifs	Séropositivité
Mâles	27	1	26	3,7%
Femelles	39	0	39	0

Le test exact de Fisher donne un **p (p-value=0,4091)** ne permettant pas de conclure sur une éventuelle différence significative entre la séropositivité et le sexe des moineaux. Le caractère sexe n'est pas un facteur de risque pour notre étude.

3.2.3.2 Résultats du test de séroneutralisation

Le test de séroneutralisation est le test de référence pour plusieurs *Flavivirus*. L'objectif de cette deuxième technique est la confirmation des résultats positifs à l'ELISA par compétition vis-à-vis du virus West Nile mais également le virus Usutu un *Flavivirus* très proche du WNV et endémique en Afrique.

Un total de 24 échantillons de sérums a été analysé par la technique de neutralisation en plaque de 96 puits. Pour 13 sérums des oiseaux capturés en 2014-2015, les résultats ont été positifs à l'ELISA par compétition Anti- *Flavivirus*. Les 11 sérums restants sont ceux dont le volume est insuffisant pour faire deux techniques, on a préféré les tester que par SNT.

3.2.3.2.1 Résultats de la séroprévalence globale

Sur les 24 sérums testés par la neutralisation sur microplaque, 11 sont positifs au WNV c'est-à-dire une séroprévalence globale du WNV de 6,6 % (IC 95% : 2,9-10,3%) avec des titres d'anticorps compris entre 1:10 et 1:40 : quatre sérums avec un titre d'anticorps 1 :10, 2 sérums avec un titre de 1 :20 et enfin Cinq sérums avec un titre d'anticorps 1 :40.

Deux sérums avec un résultat non concluant par cette technique car ils présentent un titre d'anticorps de 1 :20 pour le virus Usutu et de 1 :40 pour le virus West Nile. Enfin 3 sérums faiblement positifs à l'ELISA et 8 sérums non testés par la première technique sont négatifs à la séroneutralisation. Donc nous rapportant une séroprévalence pour les autre *Flavivirus* de 3% (2 sérums avec un titres

d'anticorps non-concluant et 3 positifs à l'ELISA et négatifs à la séroneutralisation). La prévalence du USUV est de 0% dans cette étude, on n'a pas pu conclure la circulation de ce virus chez l'avifaune testée.

Le test Chi-deux de Pearson donne une valeur $p(p\text{-value})=0,002803$, une valeur strictement inférieure à 0,05, ce que permet de conclure une différence statistiquement significative de fréquence des différents virus testés.

3.2.3.2.2 Résultats de la séroprévalence en fonction d'espèce

3.2.3.2.2.1 Virus West Nile

Par manque de moyens, La séroneutralisation a concerné uniquement les prélèvements faits en 2014-2015 alors seulement deux espèces d'oiseaux étaient testées.

Parmi les 11 oiseaux séropositifs au WNV, 72% appartiennent à la grive (8/11) et 28% sont des moineaux (3/11) (Tableau & figure). Un test exact de Fisher est réalisé à partir de ces données, il donne une valeur $P=0,1305$ ne permettant pas de conclure une différence significative dans les séroprévalences des deux espèces. Les résultats obtenus par la SNT ne montrent pas d'influence significative de l'espèce sur la séropositivité.

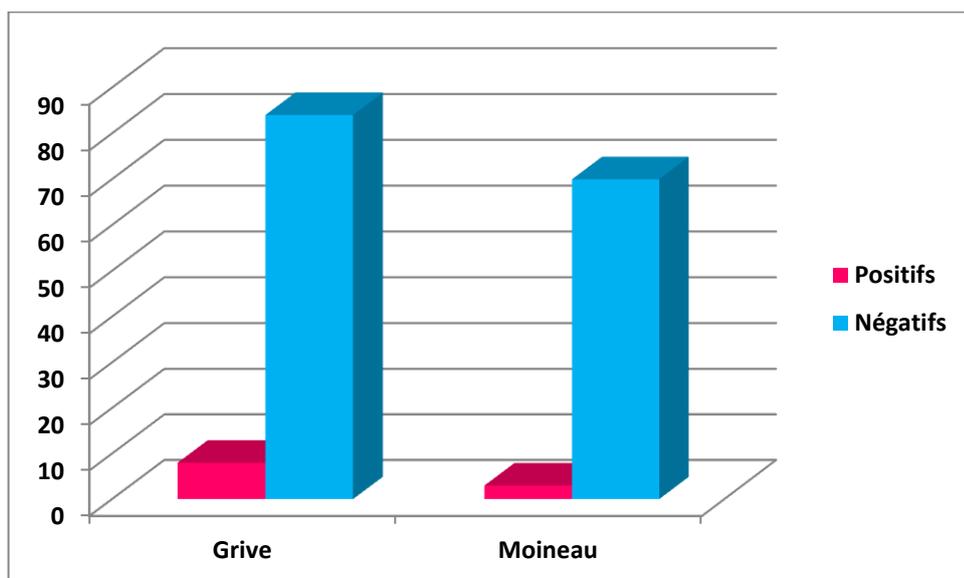


Figure 3.2.5. Séropositivité selon l'espèce par SNT

Tableau 3.2.7 : Résultats des la séroneutralisation pour les deux virus West Nile et Usutu

Enquêt Oiseaux Algérie	Kit compétition WNV IgG IDVET		Resultats Usutu	Resultat WNV	Conclusion
Identification	DO IgG	Résultat IgG	Souche Italie 2013	Souche Is98	
M50			Neg	Neg	Négatif
G49			Neg	Neg	Négatif
M41			Neg	Neg	Négatif
G28			Neg	/	Négatif
G27			Neg	Neg	Négatif
M27			Neg	Neg	Négatif
M12			Neg	Neg	Négatif
M11			Neg	Neg	Négatif
M8			Neg	Pos(10)	WNV
G99			Gr++	Pos(40)	WNV
F52			Neg	Pos(40)	WNV
110-G26	49	DOUTEUX	Neg	Neg	Flavivirus
92-G41	11	POSITIF	Neg/10	Pos(40)	WNV
73-G65	13	POSITIF	Pos(20)	Pos(40)	Flavivirus
66-G93	18	POSITIF	Neg	Pos(10)	WNV
38-G82	20	POSITIF	Neg	Neg	Flavivirus
35-G58	13	POSITIF	Pos(10)	Pos(40)	WNV
21-G3	19	POSITIF	Neg	Pos(10)	WNV
16-G85	22	POSITIF	Neg	Neg	Flavivirus
10-G30	10	POSITIF	Pos(10)	Pos(40)	WNV
80-G40	27	POSITIF	Neg	Pos(20)	WNV
154-G66	12	POSITIF	Pos(20)	Pos(40)	Flavivirus
137-M44	37	POSITIF	Neg	Pos(20)	WNV
121-G72	16	POSITIF	Neg	Pos(10)	WNV

3.2.3.2.2. Autres *Flavivirus*

Tous les sérums positifs au autres *Flavivirus* sont des oiseaux migrateurs (5/5) c'est-à-dire une séropositivité de 5,4% (IC 95% : 0,8-10%) pour la grive et 0% pour le moineau. Le test Khi2 corrigé de Yates réalisé à partir de ces chiffres a montré une valeur de $p=0,1175$, ce qui ne permet pas de constater une différence statistiquement significative entre l'espèce d'oiseau et l'infection à des *Flavivirus* autre que le WNV.

3.2.3.2.3 Résultats de la séroprévalence en fonction de sexe

Les 3 moineaux positifs dans notre étude sont répartis en 2 mâles et une femelle. La séropositivité est de 6% et 5% chez le mâle et femelle respectivement.

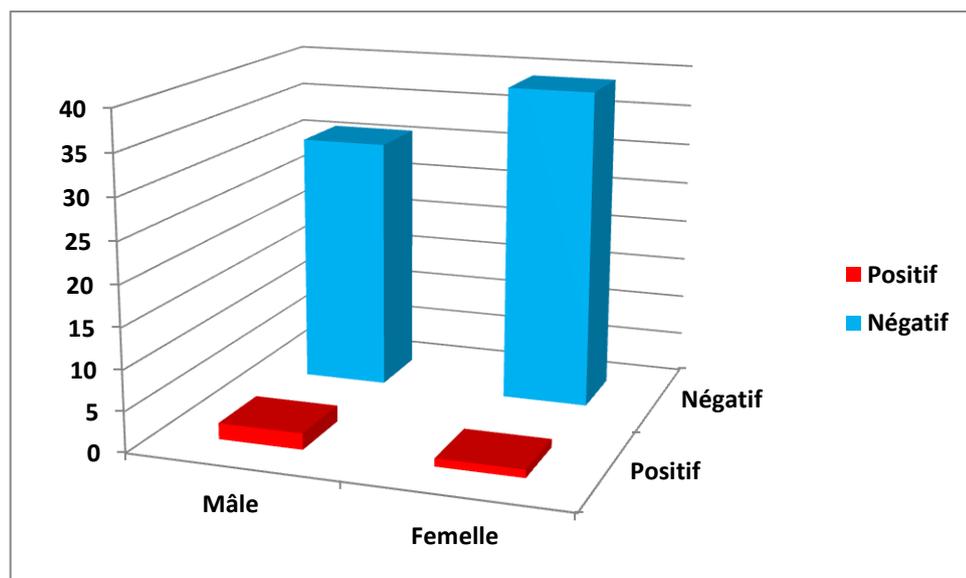


Figure 3.2.6. Répartition des cas positifs selon le sexe des moineaux

Le sexe de moineau n'est pas un facteur du risque pour l'infection au WNV dans notre enquête (p -value de Khi2 corrigé de Yates=0,8647).

3.2.3.2.4 Résultats de la séroprévalence en fonction de site de capture

3.2.3.2.4.1. Virus West Nile

Parmi les 11 oiseaux révélés positifs à la SNT, 10 capturés à Tizi-Ouzou et 1 oiseau à Bejaia c'est à dire un taux de 90,9% pour la wilaya de Tizi-Ouzou, 9,1 pour la wilaya de Bejaia et 0% pour la wilaya de Bouira. La positivité des oiseaux est de 10,3% (10/97), 1,9% (1/52) et de 0% (0/16) pour Tizi-Ouzou, Bejaia et Bouira respectivement.

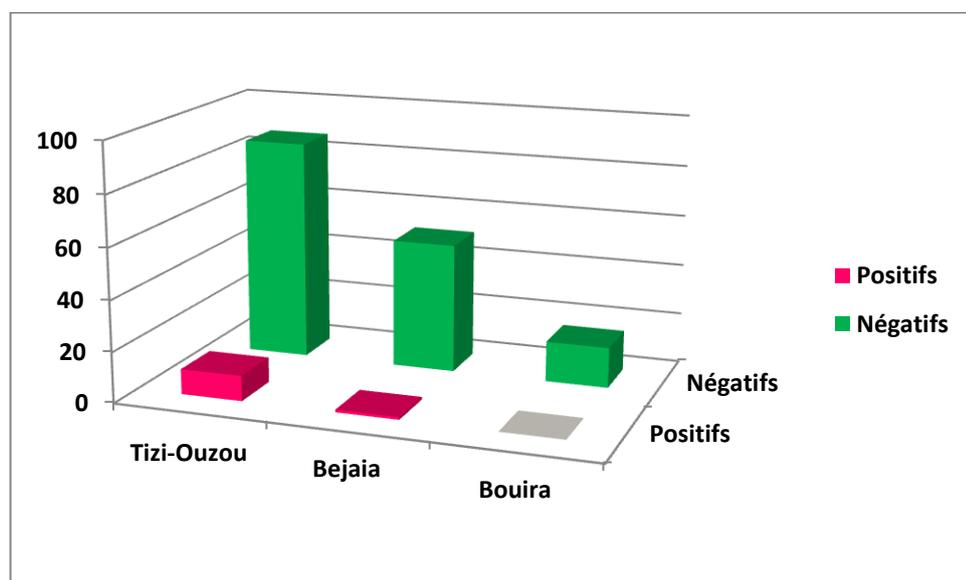


Figure 3.2.7. La répartition des cas positifs au WNV selon la wilaya

Dans notre étude, il semblait que le site de capture n'influence pas la séropositivité des oiseaux vis-à-vis du WNV (p -value=0,0784).

3.2.3.2.4.2. Autres *Flavivirus*

Dans notre étude, les 5 oiseaux positifs aux *Flavivirus* autres que le WNV sont repartis sur deux wilayas, 4 pour la wilaya de Tizi-Ouzou et 1 pour la wilaya de Bejaia. Aussi le site de capture n'a aucune relation significative avec la positivité des oiseaux pour les autres *Flavivirus*.

3.3. Discussion

3.3.1. Choix de thème et population d'étude

Les maladies émergentes et ré-émergentes constituent un sérieux problème en santé publique et vétérinaires. Au cours de ces 30 dernières années, au moins 30 nouvelles maladies infectieuses ont fait leur apparition, menaçant la vie des millions de personnes dans le monde et causant des pertes économiques énormes. Les facteurs qui contribuent à l'émergence ou la réémergence sont nombreux : l'urbanisation et la destruction des habitats naturels ; le changement climatique et l'évolution écologique, le changement des populations des hôtes et des vecteurs, les échanges et commerce internationaux ...etc. le vrai défi à relever pour lutter contre ces infections est que beaucoup d'entre elles sont sans traitement ni vaccin [261]. Les arbovirus représentent une majeure partie des pathologies émergentes et ré-émergentes en raison non seulement de la diversité de leur étiologie mais aussi de leur mode de transmission et de leur écologie. Plusieurs exemples de nouvelle introduction d'arbovirus dans des zones indemnes sont à citer à savoir : le virus Chikungunya et le virus Zika en Amérique en 2013 [262] et 2015 [263] respectivement, la réémergence du virus de la fièvre jaune en Angola et au Brésil en 2016 et 2017 [264,265] respectivement ou encore la dengue en Réunion du France [266].

Le virus West Nile est l'arbovirus le plus répandu dans le monde [16]. Il appartient à la famille des *Flaviviridae* et au genre *Flavivirus*. Ce virus reste une cause fréquente des épidémies d'encéphalites. Les oiseaux sauvages sont les principaux réservoirs naturels du WNV et l'avifaune migratrice peut être derrière la dissémination et la distribution géographique de ce dernier. Les différents épisodes identifiés en Europe et dans le Bassin méditerranéen suggèrent que le WNV introduit dans des nouvelles régions le long des voies de migration des oiseaux. L'émergence peut survenir à tout moment là où sont réunies les conditions favorables surtout dans les zones humides des régions tempérées [267].

L'Afrique et l'Europe sont reliées par la voie de migration Paléarctique, où deux fois par année des milliards d'oiseaux traversent la méditerranée pour rejoindre un continent ou un autre [3]. L'Algérie avec plus de 60 zones humides d'importance internationale constitue des zones d'accueil et de stationnement de

choix pour l'hivernage ou pour la reproduction pour plusieurs espèces d'oiseaux. L'avifaune sauvage migratrice durant son trajet peut transporter avec elle le virus West Nile et introduire des nouvelles lignages et clusters plus pathogènes à ces zones où les moustiques et les tiques en abondance. L'épidémiologie, l'écologie et les facteurs favorisant l'apparition des épidémies ou des épizooties à WNV sont mal-connus même si le virus West Nile circule d'une manière endémique en Algérie [20]. L'exploration de l'éco-épidémiologie du WNV en Algérie s'avère très importante et la mise en évidence du rôle des oiseaux sauvages dans la circulation et la propagation de cette arbovirose facilitera la prévention.

3.3.2. Méthode d'échantillonnage et taille d'échantillon

Notre travail avait pour but de comprendre l'éco-épidémiologie du WNV chez les oiseaux migrateurs et sédentaires (pré-domestiques), pour estimer la prévalence afin d'évaluer le risque de réémergence de cet agent d'arbovirose. Le calcul de la taille d'échantillon était basé sur un échantillonnage aléatoire simple. Cependant, dans le cas de l'avifaune sauvage, le tirage ne peut pas être réellement aléatoire, d'une part, freiné par l'impossibilité de construire une liste exhaustive du fait que la population réelle d'oiseaux demeure inconnue et d'autre part, il existe des biais de sélection. En effet, quelque soit la technique de piégeage certains individus sont sélectionnés plutôt que d'autres [268] (généralement certaines espèces et les oiseaux jeunes sont plus faciles à capturer). Le choix de la population d'étude est guidé par trois principaux critères : le rôle de l'espèce dans l'épidémiologie du WNV, l'abondance de cette dernière dans la région d'étude et la facilité relative de capture. Nous avons travaillé sur le genre passériformes et columbiformes pour ces trois raisons citées.

Nous sommes persuadés que le protocole d'échantillonnage répond parfaitement à notre objectif qui est de détecter une éventuelle circulation insidieuse du WNV chez deux espèces d'oiseaux signalées amplificatrices de la maladie, à savoir, deux espèces migratrices (grive & étourneau) et deux autres espèces sédentaires pré-domestiques (le moineau & le pigeon). Néanmoins, quelques biais de sélection qualifiés « obligatoires » peuvent être signalés comme le refus de certains propriétaires de placer les filets ou encore l'insécurité dans certains sites (vole des filets, sujets et destruction des filets). Cependant, des

études au niveau de laboratoire s'avèrent nécessaires afin de quantifier la compétence des espèces hôtes, de différents vecteurs compétents mais aussi l'interaction moustique compétent- oiseau compétent.

3.3.3 Méthodes de laboratoire

Les réactions croisées entre les *Flavivirus* sont un problème crucial dans la surveillance du WNV dans le monde entier. Dans le Bassin méditerranéen en particulier, la co-circulation de plusieurs *Flavivirus* représente un vrai défi dans le diagnostic sérologique [269]. Il est donc d'une importance primordiale de mesurer ces réactions croisées afin d'évaluer correctement les résultats des tests sérologiques. En Algérie, le manque de données sur les *Flavivirus* circulants rend délicat l'interprétation des résultats. Nous avons utilisé 02 techniques d'analyses sérologiques afin de confirmer la circulation du WNV. Le premier test est l'ELISA par compétition (kit commercial : ID Screen West Nile Competition IDvet) utilisé comme une méthode de screening. Le deuxième test est la séroneutralisation sur microplaque technique de confirmation pour le WNV. Nous avons tenté aussi de détecter par ce deuxième test sérologique les anticorps anti-USutu, un virus endémique en Afrique [25].

La technique ELISA fait partie des épreuves sérologiques recommandées par l'OIE dans le cadre de screening et pour des fins d'épidémiologie-surveillance [239]. Par conséquent, ce test sérologique utilisé était adapté au concept de cette enquête de séroprévalence car il permettait de détecter les IgG anti-protéine E chez plusieurs espèces animales. La sensibilité de ce test est estimée à 100% comparé au test de référence mais avec une spécificité relativement faible de 79,5% à cause de nombreuses réactions croisées (en particulier avec le virus Usutu et Bagaza) [87]. Le kit ELISA par compétition présente les avantages d'être rapide, facile à utiliser et dépend pas de l'espèce animale.

La séroneutralisation sur microplaque est la méthode de référence de l'OIE en sérologie du WNV [140], utilisée pour la confirmation d'un résultat positif au test ELISA et pour le titrage. Ce test nécessite la manipulation du virus ce qui conduit au niveau de sécurité exigé en laboratoire (niveau de confinement 3).

3.3.4 Etude de la séroprévalence

Dans le Bassin méditerranéen, le lien entre la circulation du WNV et l'implication des oiseaux migrateurs dans les réintroductions et la réémergence est très documenté [248–252,267,270]. En Algérie, à notre connaissance, l'hypothèse du rôle des oiseaux migrateurs dans la réintroduction et la distribution des nouvelles souches, lignages et clusters n'était pas prouvée, aucune étude n'est consacrée dans ce sens. Dans notre pays, les oiseaux migrateurs venant de l'Europe fin septembre début octobre pour passer l'hiver, ou proviennent de l'Afrique sub-saharienne pour traverser la méditerranée et rejoindre l'Europe en faisant escale en Afrique du Nord dans les zones humides [246]. Ces oiseaux pouvaient agir en hôte réintroductrice du WNV soit en présentant une virémie juste avant leur arrivée capable d'infecter les moustiques vecteurs ou par excrétion oro-fécale mode capable infecter directement les oiseaux, Enfin, soit en transportant des tiques infectés capables de disséminer l'infection localement.

3.3.4.1. Discussion des résultats WNV

Notre étude a confirmé pour la première fois l'exposition des oiseaux sauvages au WNV en Kabylie, une région dans le nord centre de l'Algérie. Les résultats obtenus montrent une séroprévalence globale à L'ELISA de 8,3% (4,9-11,7% à 95% IC) pour les 4 espèces d'oiseaux testés ; et de 6,6% (2,9-10,3% à IC 95%) à la séroneutralisation pour la grive et le moineau seules ces deux espèces ont fait l'objet de cette technique. Ces résultats indiquent une faible prévalence endémique dans la région d'étude.

Nos résultats peuvent être expliqués par le caractère endémique du WNV dans le Bassin méditerranéen [16] mais aussi par le fait que des épidémies et des épizooties sont périodiquement signalées dans les pays limitrophes à savoir la Tunisie (2010, 2011, 2012 et 2015) et au Maroc (2010, 2011) [19] et plus d'une dizaine d'étude sur la circulation de cet flavivirus dans ces deux pays voisins [271]. Ces résultats viennent de confirmer les résultats rapportés par Lafri et al en 2014, ces derniers ont signalé une prévalence de 17,8% chez les équidés de l'Est de l'Algérie (Annaba, Skikda et El Tarf) [21] une région connue par ses zones humides, endroit idéal par la circulation du WNV (présence en abondance de vecteurs et site privilège des oiseaux migrateurs). Récemment, l'institut Pasteur

d'Alger a réalisé une enquête chez l'homme à Alger et a ces alentours, ils ont enregistré une prévalence de 6,7% [22] ce que concorde avec les taux dans notre étude chez l'avifaune sauvage et une autre preuve que le WNV circule en permanence dans le nord algérien. Il faut signaler aussi que le virus est isolé récemment chez le moustique *Culex perexiguus* dans les oasis du Sahara algérienne [234].

Nos résultats semblaient être statistiquement proches de ceux obtenus par la récente étude conduite au sud de la Tunisie chez des colombes sédentaires (*Spilopelia senegalensis*), l'étude a révélé une prévalence de 9,7% [272]. A signaler également que nos taux de prévalence sont similaire aux résultats rapportés par Barros et al (2011) [273] au Portugal qui ont rapporté une séroprévalence de 12,6% chez des oiseaux sauvages et ceux des parcs zoologiques en utilisant le même kit Elisa utilisé dans cette étude nécessaire pour le screening (ID-Vet). Notre séroprévalence est également assez similaire à celle obtenue par Figuerola et al (2008) [26] en Espagne (10,4%) en utilisant la technique de la séroneutralisation. Par ailleurs, nos résultats semblaient proches de ceux rapportés par Llopis et al. (2015) [274] en Italie avec une prévalence obtenue de 4,3% chez des oiseaux sauvages en utilisant le test de référence du WNV.

Par ailleurs, la séroprévalence enregistrée dans notre enquête est inférieure à celle signalée chez des passériformes dans les oasis tunisiens, Ayadi et al., ont enregistré un prévalence de 32 % chez les espèce d'oiseaux testées [275]. Cette fluctuation dans les résultats pourrait être expliquée par la région d'étude, ces tunisiens ont réalisés des prélèvements dans des oasis sites d'escale des oiseaux migrateurs et endroits riche en vecteurs compétents. Nos chiffres sont également inférieur à ceux rapporté par Wadak et al (2011) [276]. Ces derniers ont rapporté une séroprévalence de 43,7% sur les 71 oiseaux prélevés. Cette différence évidente dans les taux de séroprévalence pourrait être expliquée par le fait que leurs prélèvements ont été réalisés juste après l'épidémie survenue en 2008 dans la région Est de l'Autriche. De même, Diaz et al (2008) [277] dans leur étude menée en Argentine ont rapporté une séroprévalence de 25,6% (taux statistiquement différent de celui obtenu dans notre étude). 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 et al (2012) [278] 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 séroprévalences chez l'avifaune sauvage statistiquement plus faible comparée à celle obtenue dans notre étude. Citons l'exemple des travaux de Lopès et al (2011) [279] 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). Une autre étude en Inde, menée par Mishra et al (2012) [280] a rapporté une séroprévalence de 2,46 chez des oiseaux sauvages.

Cependant, Les résultats de cette enquête doivent être considérer avec prudence vue la délicatesse d'interprétation des résultats des utiles de diagnostic sérologique dans le cas de *Flavivirus*, d'une part lors de la coinfection comme il le démontre Eybpoosh et al., dans leur étude expérimentale lors de co-infection par 3 flavivirus à savoir WNV, USUV et le virus Bagaza, ces trois virus largement répandus en Europe et en Afrique [271]. D'une autre part, la détection des IgG ne renseigne pas sur le moment de l'infection chez le sujet séropositif car les IgG persistent longtemps dans les sérums des animaux [84].

3.3.4.1.1 Discussion des résultats WNV en fonction de l'espèce

Plus de 150 espèces d'oiseaux sont sensibles au WNV [69], 77 espèces appartiennent à 29 familles et à 12 ordres d'oiseaux sont expérimentalement testés au laboratoire afin de déterminer leur compétence d'amplification et d'observer les différents signes cliniques [257]. Dans notre enquête, on s'est intéressé à 2 familles d'oiseaux : les passériformes et les columbiformes. Les passériformes sont connus pour leur rôle très important dans l'amplification du WNV surtout le moineau, les columbiformes moins sensibles au WNV mais représentent un bon indicateur épidémiologique contrairement aux corvidés très vulnérables avec une mortalité accrue ce qui les rend d'intérêt moins important dans l'épidémio-surveillance [120].

A l'issue de notre étude, nous avons enregistré un taux de séroprévalence dans la population migratrice de 8,7% et de 6,3% pour la grive et l'étourneau respectivement et dans la population sédentaire de 4,1% et de 10% pour le moineau et le pigeon respectivement. La présence des anticorps dans les sérums des oiseaux suggérait à la fois un risque de réémergence de la maladie par l'intermédiaire des oiseaux migrateurs qui pouvaient introduire des souches plus pathogènes mais aussi une circulation du virus produit localement chez l'espèce sédentaire. Dans notre enquête, le test de Khi2 montre que le risque d'être infecté est le même quelle que soit l'espèce migratrice ou sédentaire [p (p -value)= 0,05349].

Notre constat a propos de la relation entre l'espèce d'oiseau et l'infection au WNV est différent de celui rapporté par Ayadi et al., en 2019, ces derniers ont montré que l'oriole doré (*Oriolus oriolus*) est l'espèce la plus touchée parmi les 5 espèces incluses dans leur étude [275]. Cette différence de taux d'infection entre les espèces pourrait être expliquée soit par le trajet et les endroits fréquentés par l'espèce migratrice avant d'arriver au lieu de capture, soit par l'affinité de vecteurs compétents à certaines espèces d'oiseaux [281,282]. Nos résultats sont aussi différents avec ceux rapportés par Lelli et al (2010) [283] en Italie qui ont enregistré une séroprévalence faible pour les espèces sédentaires de 0,1-0,6% ; et ceux rapporté en Tunisie par Bargaoui et al (2012) [284] : 24% pour les espèces migratrices contre 5% pour les espèces pré et domestiques. Cependant, Figuerola et al (2008) en Espagne n'ont pas démontré une différence significative entre les espèces sédentaires (3,32% +/- 8,13) et migratrices (5,23%) [285].

3.3.4.1.2 Discussion des résultats WNV en fonction région

Il est bien connu que l'écosystème joue un rôle très important dans la circulation du WNV. La présence de vecteur compétent comme *Culex pipiens* (moustique urbain) et *Cx. modestus* dans des zones humides, rizières et roselières en Camargue par exemple favorise la transmission.

Les résultats obtenus concernant la séropositivité en fonction du site de capture montrent qu'il y a une différence statistiquement significative entre ces deux variables ($p=0,03989$). En effet, la wilaya de Tizi-Ouzou semblait être plus touchée avec une prévalence de 12% par rapport à la wilaya de Bejaia et Bouira

avec des prévalences de 4,5% et de 3,3% respectivement. Cependant, il faut signaler que la majorité des oiseaux positifs dans cette étude sont des passériformes migrateurs capturés durant la période d'absence d'activité de vecteur (en hiver), ce que signifie probablement que ces oiseaux ont été infectés en Europe. La différence dans la positivité en fonction de la wilaya pourrait être reliée à la taille d'échantillon et non pas au site de capture.

Hammouda et al (2015) ont rapporté que le lieu de capture n'est pas un facteur de risque pour l'infection au WNV, 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%) [286]. En revanche, Diaz et al (2008) ont rapporté une différence significative entre les sites de capture [277], cette différence a été expliquée par les variations climatiques entre les lieux de capture.

3.3.4.1.3 Discussion des résultats WNV en fonction du sexe

Dans notre travail, seul le sexe des moineaux a été déterminé. Nos résultats n'ont montré aucune différence statistiquement significative entre la séropositivité et le sexe de moineau. Le sexe n'est pas un facteur de risque dans la population de moineaux étudiée. Par contre, Ayadi et al ont signalé que chez les orioles dorées positifs au WNV le mâle est deux fois plus exposé au virus que la femelle de cette espèce [275]. Cela suggère une exposition plus importante des mâles aux piqueurs des moustiques vecteurs, un rapport sur les repas sanguins journaliers du *Culex* révèle que ces moustiques prennent deux fois plus de sang chez le mâle que chez la femelle des oiseaux [287]. En effet, cela pourrait être dû à la différence d'hormones entre les deux sexes [288] le mâle a un niveau plus élevé en testostérone par conséquent un niveau de stress plus élevé qui attire les moustiques [289]. Enfin, le dimorphisme sexuel pourrait jouer un rôle dans l'attraction des moustiques vers un sexe ou un autre. En revanche, Hammouda et al n'ont pas mentionné le sexe comme facteur de risque lors d'infection au WNV [286].

3.3.4.2. Discussion des résultats virus Usutu

Le virus Usutu est un arbovirus africain et endémique dans ce continent, mis en évidence pour la première fois en Afrique du Sud en 1959 par M. Mc Istash chez le moustique *Culex neavei* [24]. Depuis il a été isolé en Sénégal, en République centrafricaine, Burkina Faso, Coté d'Ivoire, Nigeria et Ouganda [25] ; les anticorps Anti-Virus Usutu ont été détectés au Maroc chez des oiseaux sauvages [26] et récemment en Tunisie chez les équidés [290] et chez les oiseaux [275]. En Europe, le virus circulait déjà dans les années 1990, comme le suggère une étude rétrospective dans des tissus conservés d'un merle noir (*Turdus merula*) morte à Toscana en Italie [291]. A partir de 2001, le virus émerge en Europe, une épidémie s'éclate en Autriche, depuis le virus a été isolé dans 10 pays (Allemagne, Autriche, Belgique, Espagne, Italie, République tchèque, Serbie, Suisse, France et Hongrie) ; des anticorps USUV ont été détectés, en Croatie, en Hongrie, en Pologne, en Grèce et en Slovaquie [27]

Dans notre étude aucun sérum positif aux *Flavivirus* n'est révélé positif au USUV et cela malgré que le virus est endémique en Afrique et signalé à maintes reprises en Tunisie et au Maroc ces dernières années. Il faut ajouter que plusieurs espèces d'oiseaux migratrices sont responsables de l'introduction de ce virus en Europe à partir de l'Afrique. Plusieurs hypothèses pouvaient expliquer ce résultat négatif. Premièrement, le virus Usutu est hautement pathogène pour certaines espèces d'oiseaux, en particulier les passériformes [292] donc la majeure partie infectée par USUV meurent ce que rend la détection des anticorps délicate. Dans ce travail, plus de 5/6 sont des passériformes ce que diminue la probabilité de détecter des cas positifs. Deuxièmement, une récente étude montre que la co-circulation des *Flavivirus* qui présentent des réactions croisées pourrait affecter les résultats des utiles sérologiques disponibles actuellement [269], Donc le choix de la méthode de dépistage sérologique doit tenir en compte de la spécificité d'un test. La technique ELISA reste le meilleur choix pour le screening du WNV mais pas pour le virus Usutu ou autre *Flavivirus*.

CONCLUSION

En Algérie, la situation réelle du WNV demeure inconnue. En effet, peu d'études ont été consacrées à l'éco-épidémiologie de cette arbovirose bien qu'elle soit considérée comme une maladie émergente et ré émergente dans le Bassin méditerranéen et une maladie à déclaration obligatoire chez les oiseaux par les autorités algériennes.

Cette étude nous a permis d'avoir un aperçu sur la circulation du virus West Nile au sein de l'avifaune sauvage dans la Kabylie mais également de détecter la circulation des flavivirus autre que le WNV chez des espèces migratrices. L'ELISA a montré une séroprévalence globale de 8,3% [IC : 4,9-11,7%] et une séropositivité de 13,6%, 6,3%, 1,5% et 10% pour la grive, l'étourneau, le moineau et le pigeon respectivement. La séroneutralisation sur microplaque a confirmé une prévalence du WNV de l'ordre de 6,6% [IC 95% : 2,9-10,3%] avec une positivité de 8,6% et de 4,1 % chez la grive et le moineau deux espèces concernées par ce second test. Aucun cas des sérums positifs testés n'est révélé positif à USUV. Enfin, une prévalence de 3% pour les *Flavivirus* autres que WNV et USUV.

Même si la séroprévalence s'est montrée faible chez les principaux amplificateurs de cette arbovirose, le risque de réémergence de la fièvre du nil occidental en Algérie n'est pas à mettre à l'écart, vu le nombre considérable des oiseaux venant des pays signalés endémiques de la maladie et traversant notre pays, mais également en raison du changement climatique.

Les différents renseignements collectés au cours de notre recherche nous ont permis d'étudier certains facteurs de risque. Il en ressort que seul la région d'étude influence la prévalence du WNV. L'espèce et le sexe ne constituent pas des facteurs du risque dans notre étude. Toutefois, les paramètres tels l'espèce, le sexe ou encore le lieu géographique sont à considérer pour une étude ultérieure en élargissant la taille d'échantillon et en diversifiant les espèces incluses.

L'avifaune sauvage a constitué en fait un bon indicateur d'épidémiologie-surveillance pour la fièvre de nil occidental dans la région d'étude. En dépit des différentes contraintes, cette étude est qualifiée pour être la première tentative en

Algérie qui a mis en évidence la circulation du WNV chez l'avifaune sauvage.
Nous estimons que nous avons pu atteindre l'objectif de cette étude.

RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES

Dans les pays indemnes ou bien dans les pays où le WNV 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 [397] ou en Afrique du Sud [220] ; ou des cas graves chez l'homme à l'exemple de l'épidémie de la Roumanie en 1996 [363] ou en Italie en 2008 [363] ; [408] ou enfin celle de Grèce par la lignée 2 en 2010 [324].

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

➤ Surveillance passive :

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

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

Equin : la déclaration obligatoire des suspicions d'encéphalites équines par les vétérinaires sanitaires auprès de la direction générale des services vétérinaires avec la recherche systématiques du WNV sur les syndromes nerveux détectés.

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 WNV 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 WNV sur les encéphales des cadavres d'oiseaux sauvages collectés par les services forestiers. Elle se fait aussi par la surveillance de la circulation du virus sur les oiseaux sentinelles.

Volet entomologique : la surveillance entomologique consiste à faire l'inventaire des espèces culicidiennes et une recherche du WNV chez les moustiques capturés autour des foyers équin 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, 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.

Reference:

- [1] W.B. Karesh, R.A. Cook, E.L. Bennett, J. Newcomb, Wildlife trade and global disease emergence, *Emerg. Infect. Dis.* 11 (2005) 1000.
- [2] T. Alerstam, Detours in bird migration, *J. Theor. Biol.* 209 (2001) 319–331.
- [3] S. Hahn, S. Bauer, F. Liechti, The natural link between Europe and Africa—2.1 billion birds on migration, *Oikos.* 118 (2009) 624–626.
- [4] J. Owen, F. Moore, N. Panella, E. Edwards, R. Bru, M. Hughes, N. Komar, Migrating birds as dispersal vehicles for West Nile virus, *Ecohealth.* 3 (2006) 79.
- [5] I. Pascucci, M. Di Domenico, G.C. Dondona, A. Di Gennaro, A. Polci, A.C. Dondona, E. Mancuso, C. Cammà, G. Savini, J.G. Cecere, Assessing the role of migratory birds in the introduction of ticks and tick-borne pathogens from African countries: An Italian experience, *Ticks Tick. Borne. Dis.* 10 (2019) 101272.
- [6] C.H. Calisher, B. Dodet, D. Griffin, Emergence and control of zoonotic viral encephalitis, *Emerg. Infect. Dis.* 9 (2003) 1029.
- [7] F. Monaco, M. Goffredo, P. Briguglio, C. Pinoni, A. Polci, S. Iannetti, G. Marruchella, G. Di Francesco, A.P. Di Gennaro, M. Pais, The 2011 West Nile disease outbreak in Sardinia region, Italy, *Vet. Ital.* 51 (2015) 5–16.
- [8] J. Kolodziejek, M. Marinov, B.J. Kiss, V. Alexe, N. Nowotny, The complete sequence of a West Nile virus lineage 2 strain detected in a *Hyalomma marginatum marginatum* tick collected from a song thrush (*Turdus philomelos*) in eastern Romania in 2013 revealed closest genetic relationship to strain Volgograd 2007, *PLoS One.* 9 (2014) e109905.
- [9] O.W. Lwande, M. Venter, J. Lutomiah, G. Michuki, C. Rumberia, F. Gakuya, V. Obanda, C. Tigo, C. Odhiambo, F. Nindo, Whole genome phylogenetic investigation of a West Nile virus strain isolated from a tick sampled from livestock in north eastern Kenya, *Parasit. Vectors.* 7 (2014) 542.
- [10] M.H. V van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K.

- Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle, Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses., Academic Press, 2000.
- [11] S.M. Lim, M. Geervliet, J.H. Verhagen, G.J.D.M. Müskens, F.A. Majoor, A.D.M.E. Osterhaus, B.E.E. Martina, Serologic evidence of West Nile virus and Usutu virus infections in Eurasian coots in the Netherlands, *Zoonoses Public Health*. 65 (2018) 96–102. doi:10.1111/zph.12375.
- [12] U. Ziegler, H. Jöst, K. Müller, D. Fischer, M. Rinder, D.T. Tietze, K.-J. Danner, N. Becker, J. Skuballa, H.-P. Hamann, S. Bosch, C. Fast, M. Eiden, J. Schmidt-Chanasit, M.H. Groschup, Epidemic Spread of Usutu Virus in Southwest Germany in 2011 to 2013 and Monitoring of Wild Birds for Usutu and West Nile Viruses, *Vector-Borne Zoonotic Dis.* (2015). doi:10.1089/vbz.2014.1746.
- [13] K.C. Smithburn, T.P. Hughes, A.W. Burke, J.H. Paul, A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda 1, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (1940). doi:10.4269/ajtmh.1940.s1-20.471.
- [14] L.D. Kramer, J. Li, P. Shi, Kramer - West Nile Virus - *Lancet Neurol* 2007, 6 (2007) 1999–2005.
- [15] T.F. Tsai, F. Popovici, C. Cernescu, G.L. Campbell, N.I. Nedelcu, West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania, *Lancet.* (1998). doi:10.1016/S0140-6736(98)03538-7.
- [16] B. Murgue, S. Murri, H. Triki, V. Deubel, H.G. Zeller, West Nile in the Mediterranean basin: 1950-2000., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (2001).
- [17] A.E. Platonov, G.A. Shipulin, O.Y. Shipulina, E.N. Tyutyunnik, T.I. Frolochkina, R.S. Lanciotti, S. Yazyshina, O. V. Platonova, I.L. Obukhov, A.N. Zhukov, Y.Y. Vengerov, V.I. Pokrovskii, Outbreak of West Nile virus infection, Volgograd Region, Russia, 1999, *Emerg. Infect. Dis.* (2001). doi:10.3201/eid0701.010118.
- [18] K. Danis, A. Papa, G. Theocharopoulos, G. Dougas, M. Athanasiou, M.

- Detsis, A. Baka, T. Lytras, K. Mellou, S. Bonovas, Outbreak of West Nile virus infection in Greece, 2010, *Emerg. Infect. Dis.* 17 (2011) 1868.
- [19] A. Benjelloun, M. El Harrak, B. Belkadi, West Nile Disease Epidemiology in North-West Africa: Bibliographical Review, *Transbound. Emerg. Dis.* (2016). doi:10.1111/tbed.12341.
- [20] I. Lafri, A. Hachid, I. Bitam, West Nile virus in Algeria : a comprehensive overview, *New Microbes New Infect.* 27 (2019) 9–13. doi:10.1016/j.nmni.2018.10.002.
- [21] I. Lafri, C.M. Prat, I. Bitam, P. Gravier, M. Besbaci, F. Zeroual, M.H. Ben-Mahdi, B. Davoust, I. Leparc-Goffart, Seroprevalence of West Nile virus antibodies in equids in the North-East of Algeria and detection of virus circulation in 2014, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* (2017). doi:10.1016/j.cimid.2016.11.005.
- [22] A. Hachid, M.A. Beloufa, M. Seghier, N. Bahoura, M. Dia, G. Fall, A.A. Sall, Evidence of West Nile virus circulation among humans in central northern Algeria, *New Microbes New Infect.* 29 (2019) 100512. doi:10.1016/j.nmni.2019.01.008.
- [23] P. Gaibani, G. Rossini, Corresponding Author : SC, *Microbes Infect.* (2017). doi:10.1016/j.micinf.2017.05.003.
- [24] M.C. Williams, D.I.H. Simpson, A.J. Haddow, E.M. Knight, The isolation of West Nile virus from man and of Usutu virus from the bird-biting mosquito *Mansonia aurites* (Theobald) in the Entebbe area of Uganda, *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 58 (1964) 367–374.
- [25] B. Nikolay, M. Diallo, C.S.B. Boye, A.A. Sall, Usutu Virus in Africa, *Vector-Borne Zoonotic Dis.* (2011). doi:10.1089/vbz.2011.0631.
- [26] J. Figuerola, R.E. Baouab, R. Soriguer, O. Fassi-Fihri, F. Llorente, M.A. Jiménez-Clavero, West Nile virus antibodies in wild birds, Morocco, 2008, *Emerg. Infect. Dis.* (2009). doi:10.3201/eid1510.090340.
- [27] M. Clé, S. Salinas, S. Lecollinet, C. Beck, S. Gutierrez, T. Baldet, P. Vande

- Perre, V. Foulongne, Y. Simonin, Usutu virus: The phantom menace, *Medecine/Sciences*. 34 (2018) 709–716. doi:10.1051/medsci/20183408018.
- [28] M. Galli, F. Bernini, G. Zehender, Alexander the Great and West Nile virus encephalitis, (2004).
- [29] J.S. Marr, C.H. Calisher, Alexander the Great and West Nile virus encephalitis, *Emerg. Infect. Dis.* 9 (2003) 1599.
- [30] B.A. Cunha, Alexander the Great and West Nile virus encephalitis, *Emerg. Infect. Dis.* 10 (2004) 1328.
- [31] D. Oldach, R.M. Benitez, P.A. Mackowiak, Alexander the Great and West Nile virus encephalitis., *Emerg. Infect. Dis.* 10 (2004) 1329–1330.
- [32] J.L. Melnick, J.R. Paul, J.T. Riordan, V.H. Barnett, N. Goldblum, E. Zabin, Isolation from human sera in Egypt of a virus apparently identical to West Nile virus., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 77 (1951) 661–665.
- [33] L.D. Kramer, L.M. Styer, G.D. Ebel, A global perspective on the epidemiology of West Nile virus, *Annu. Rev. Entomol.* 53 (2008) 61–81.
- [34] H. Bernkopf, S. Levine, R. Nerson, Isolation of West Nile virus in Israel, *J. Infect. Dis.* (1953) 207–218.
- [35] C.G. Hayes, West Nile fever, *Arboviruses Epidemiol. Ecol.* 5 (1989) 59–88.
- [36] L. Joubert, J. Oudar, C. Hannoun, D. Beytout, B. Corniou, J.C. Guillon, R. Panthier, Epidémiologie du virus West Nile: étude d'un foyer en Camargue. IV. La méningo-encéphalomyélite du cheval, *Ann Inst Pasteur.* 118 (1970) 239–247.
- [37] B.M. McIntosh, P.G. Jupp, I. Dos Santos, G.M. Meenehan, Epidemics of West Nile and Sindbis viruses in South Africa with *Culex* (*Culex*) *univittatus* Theobald as vector., *S. Afr. J. Sci.* 72 (1976) 295–300.
- [38] G.M. Jupp, T. NK, Sindbis and West Nile virus infections in the Witwatersrand-Pretoria region, *South African Med. J.* 70 (1986) 218–220.
- [39] P.S. Bisen, R. Raghuvanshi, *Emerging epidemics: Management and control*,

John Wiley & Sons, 2013.

- [40] B. Le Guenno, A. Bougermouh, T. Azzam, R. Bouakaz, West Nile: a deadly virus?, *Lancet*. 348 (1996) 1315.
- [41] M. Weinberger, S.D. Pitlik, D. Gandacu, R. Lang, F. Nassar, D. Ben David, E. Rubinstein, A. Izthaki, J. Mishal, R. Kitzes, West Nile fever outbreak, Israel, 2000: epidemiologic aspects., *Emerg. Infect. Dis.* 7 (2001) 686.
- [42] M. El Harrack, B. Le Guenno, P. Gounon, Isolement du virus West Nile au Maroc, *Virologie*. 1 (1997) 248–249.
- [43] C. Cantile, G. Di Guardo, C. Eleni, M. Arispici, Clinical and neuropathological features of West Nile virus equine encephalomyelitis in Italy, *Equine Vet. J.* 32 (2000) 31–35.
- [44] H. Zeller, S. Zientara, J. Hars, J. Languille, A. Mailles, H. Tolou, M.-C. Paty, F. Schaffner, A. Armengaud, P. Gaillan, West Nile outbreak in horses in southern France: September 2004, *Eurosurveillance Wkly.* 8 (2004) 7.
- [45] B. Durand, G. Dauphin, J. Labie, H. Zeller, S. Zientara, Résultats d'une enquête sérologique sur l'infection à virus West Nile chez les équidés dans le Var, en 2003, *Environnement, Risques & Santé.* 4 (2005) 114–118.
- [46] A.C. NOVELLO, West Nile virus in New York State: the 1999 outbreak and response plan for 2000, *Viral Immunol.* 13 (2000) 463–467.
- [47] A.E. Garmendia, H.J. Van Kruiningen, R.A. French, The West Nile virus: its recent emergence in North America, *Microbes Infect.* 3 (2001) 223–229.
- [48] C. Pepperell, N. Rau, S. Krajden, R. Kern, A. Humar, B. Mederski, A. Simor, D.E. Low, A. McGeer, T. Mazzulli, West Nile virus infection in 2002: morbidity and mortality among patients admitted to hospital in southcentral Ontario, *Cmaj.* 168 (2003) 1399–1405.
- [49] M.A. Morales, M. Barrandeguy, C. Fabbri, J.B. Garcia, A. Vissani, K. Trono, G. Gutierrez, S. Pigretti, H. Menchaca, N. Garrido, West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006, *Emerg. Infect. Dis.* 12 (2006) 1559.

- [50] S.C. Chaintoutis, A. Chaskopoulou, T. Chassalevris, P.G. Koehler, M. Papanastassopoulou, C.I. Dovas, West Nile virus lineage 2 strain in Greece, 2012, *Emerg. Infect. Dis.* 19 (2013) 827.
- [51] J.J. Sejvar, West Nile Virus Infection, (2016) 1–19. doi:10.1128/microbiolspec.EI10-0021-2016.Correspondence.
- [52] S. Zannoli, V. Sambri, West Nile Virus and Usutu Virus Co-Circulation in Europe: Epidemiology and Implications, *Microorganisms*. 7 (2019) 184.
- [53] A.M.Q. King, M.J. Adams, E.B. Carstens, E.J. Lefkowitz, Virus taxonomy, Ninth Rep. Int. Comm. Taxon. Viruses. (2012) 486–487.
- [54] M. POIDINGER, R.O.Y.A. HALL, J.S. MACKENZIE, Molecular characterization of the Japanese encephalitis serocomplex of the flavivirus genus, *Virology*. 218 (1996) 417–421.
- [55] T.C. Pierson, M. Diamond, Flaviviruses, in: *Fields Virol. Sixth Ed.*, Wolters Kluwer Health Adis (ESP), 2013.
- [56] M.S. Diamond, West Nile Encephalitis Virus Infection: viral pathogenesis and the host immune response, Springer Science & Business Media, 2009.
- [57] S. Mukhopadhyay, B.-S. Kim, P.R. Chipman, M.G. Rossmann, R.J. Kuhn, Structure of west nile virus, *Science* (80-.). 302 (2003) 248.
- [58] L.D. Kramer, J. Li, P.-Y. Shi, West Nile virus., *Lancet. Neurol.* 6 (2007) 171–81. doi:10.1016/S1474-4422(07)70030-3.
- [59] M.A. Brinton, The molecular biology of West Nile Virus: a new invader of the western hemisphere, *Annu. Rev. Microbiol.* 56 (2002) 371–402.
- [60] A.C. Brault, Changing patterns of West Nile virus transmission: altered vector competence and host susceptibility, *Vet. Res.* 40 (2009) 1–19.
- [61] W.J. Liu, X.J. Wang, V. V Mokhonov, P.-Y. Shi, R. Randall, A.A. Khromykh, Inhibition of interferon signaling by the New York 99 strain and Kunjin subtype of West Nile virus involves blockage of STAT1 and STAT2 activation by nonstructural proteins, *J. Virol.* 79 (2005) 1934–1942.

- [62] W.J. Liu, H.B. Chen, A.A. Khromykh, Molecular and functional analyses of Kunjin virus infectious cDNA clones demonstrate the essential roles for NS2A in virus assembly and for a nonconservative residue in NS3 in RNA replication, *J. Virol.* 77 (2003) 7804–7813.
- [63] J.L. Muñoz-Jordán, G.G. Sánchez-Burgos, M. Laurent-Rolle, A. García-Sastre, Inhibition of interferon signaling by dengue virus, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100 (2003) 14333–14338.
- [64] M.A. Brinton, Replication of flaviviruses, in: *The Togaviridae and Flaviviridae*, Springer, 1986: pp. 327–374.
- [65] S. Mukhopadhyay, R.J. Kuhn, M.G. Rossmann, A structural perspective of the flavivirus life cycle, *Nat. Rev. Microbiol.* 3 (2005) 13.
- [66] C.W. Davis, H.-Y. Nguyen, S.L. Hanna, M.D. Sánchez, R.W. Doms, T.C. Pierson, West Nile virus discriminates between DC-SIGN and DC-SIGNR for cellular attachment and infection, *J. Virol.* 80 (2006) 1290–1301.
- [67] M. Rios, S. Daniel, C. Chancey, I.K. Hewlett, S.L. Stramer, West Nile virus adheres to human red blood cells in whole blood, *Clin. Infect. Dis.* 45 (2007) 181–186.
- [68] J.J.H. Chu, M.L. Ng, Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway, *J. Virol.* 78 (2004) 10543–10555.
- [69] K.M. Van der Meulen, M.B. Pensaert, H.J. Nauwynck, West Nile virus in the vertebrate world, *Arch. Virol.* 150 (2005) 637–657.
- [70] G.R. Medigeshi, A.J. Hirsch, D.N. Streblow, J. Nikolich-Zugich, J.A. Nelson, West Nile virus entry requires cholesterol-rich membrane microdomains and is independent of $\alpha\beta 3$ integrin, *J. Virol.* 82 (2008) 5212–5219.
- [71] M.N. Krishnan, B. Sukumaran, U. Pal, H. Agaisse, J.L. Murray, T.W. Hodge, E. Fikrig, Rab 5 is required for the cellular entry of dengue and West Nile viruses, *J. Virol.* 81 (2007) 4881–4885.
- [72] J. Reyes-del Valle, S. Chávez-Salinas, F. Medina, R.M. Del Angel, Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus

- receptor complex in human cells, *J. Virol.* 79 (2005) 4557–4567.
- [73] J.J.H. Chu, P.W.H. Leong, M.L. Ng, Analysis of the endocytic pathway mediating the infectious entry of mosquito-borne flavivirus West Nile into *Aedes albopictus* mosquito (C6/36) cells, *Virology*. 349 (2006) 463–475.
- [74] B. Moesker, I.A. Rodenhuis-Zybert, T. Meijerhof, J. Wilschut, J.M. Smit, Characterization of the functional requirements of West Nile virus membrane fusion, *J. Gen. Virol.* 91 (2010) 389–393.
- [75] M.A. Martín-Acebes, J.-C. Saiz, A West Nile virus mutant with increased resistance to acid-induced inactivation, *J. Gen. Virol.* 92 (2011) 831–840.
- [76] J.M. Mackenzie, E.G. Westaway, Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively, *J. Virol.* 75 (2001) 10787–10799.
- [77] M.A. Martín-Acebes, J.-C. Saiz, West Nile virus: a re-emerging pathogen revisited, *World J. Virol.* 1 (2012) 51.
- [78] G.L. Campbell, A.A. Marfin, R.S. Lanciotti, D.J. Gubler, West Nile virus, *Lancet Infect. Dis.* 2 (2002) 519–529.
- [79] J.T. Roehrig, M. Layton, P. Smith, G.L. Campbell, R. Nasci, R.S. Lanciotti, The emergence of West Nile virus in North America: ecology, epidemiology, and surveillance, in: *Japanese Enceph. West Nile Viruses*, Springer, 2002: pp. 223–240.
- [80] L.H. Gould, E. Fikrig, West Nile virus: a growing concern?, *J. Clin. Invest.* 113 (2004) 1102–1107.
- [81] J.T. Roehrig, D. Nash, B. Maldin, A. Labowitz, D.A. Martin, R.S. Lanciotti, G.L. Campbell, Persistence of virus-reactive serum immunoglobulin M antibody in confirmed West Nile virus encephalitis cases, *Emerg. Infect. Dis.* 9 (2003) 376.
- [82] H.E. Prince, L.H. Tobler, M. Lapé-Nixon, G.A. Foster, S.L. Stramer, M.P. Busch, Development and persistence of West Nile virus-specific immunoglobulin M (IgM), IgA, and IgG in viremic blood donors, *J. Clin.*

- Microbiol. 43 (2005) 4316–4320.
- [83] G. Tardei, S. Ruta, V. Chitu, C. Rossi, T.F. Tsai, C. Cernescu, Evaluation of immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme immunoassays in serologic diagnosis of West Nile virus infection, *J. Clin. Microbiol.* 38 (2000) 2232–2239.
- [84] L.R. Petersen, A.A. Marfin, West Nile virus: a primer for the clinician, *Ann. Intern. Med.* 137 (2002) 173–179.
- [85] J. Gea-Banacloche, R.T. Johnson, A. Bagic, J.A. Butman, P.R. Murray, A.G. Agrawal, West Nile virus: pathogenesis and therapeutic options, *Ann. Intern. Med.* 140 (2004) 545–553.
- [86] J. Castillo-Olivares, K.L. Mansfield, L.P. Phipps, N. Johnson, J. Tearle, A.R. Fooks, Antibody response in horses following experimental infection with West Nile Virus lineages 1 and 2, *Transbound. Emerg. Dis.* 58 (2011) 206–212.
- [87] G. Dauphin, S. Zientara, January 2007, posting date. West Nile virus: recent trends in diagnosis and vaccine development, *Vaccine*. Doi. 10 (18AD).
- [88] M.W. Douglas, A.M. Kesson, N.J. King, CTL recognition of west Nile virus-infected fibroblasts is cell cycle dependent and is associated with virus-induced increases in class I MHC antigen expression., *Immunology*. 82 (1994) 561.
- [89] A.B. Kulkarni, A. Mullbacher, R. V Blanden, In vitro T-cell proliferative response to the flavivirus, West Nile, *Viral Immunol.* 4 (1991) 73–82.
- [90] A.M. Kesson, R. V Blanden, A. Mullbacher, The primary in vivo murine cytotoxic T cell response to the flavivirus, West Nile, *J. Gen. Virol.* 68 (1987) 2001–2006.
- [91] J.T. Harty, V.P. Badovinac, Influence of effector molecules on the CD8+ T cell response to infection, *Curr. Opin. Immunol.* 14 (2002) 360–365.
- [92] J.H. Russell, T.J. Ley, Lymphocyte-mediated cytotoxicity, *Annu. Rev. Immunol.* 20 (2002) 323–370.

- [93] T.W. Kelley, R.A. Prayson, A.I. Ruiz, C.M. Isada, S.M. Gordon, The neuropathology of West Nile virus meningoencephalitis: a report of two cases and review of the literature, *Am. J. Clin. Pathol.* 119 (2003) 749–753.
- [94] L.J. Johnston, N.J.C. King, G.M. Halliday, Langerhans cells migrate to local lymph nodes following cutaneous infection with an arbovirus, *J. Invest. Dermatol.* 114 (2000) 560–568.
- [95] S.N. Byrne, G.M. Halliday, L.J. Johnston, N.J.C. King, Interleukin-1 β but not tumor necrosis factor is involved in West Nile virus-induced Langerhans cell migration from the skin in C57BL/6 mice, *J. Invest. Dermatol.* 117 (2001) 702–709.
- [96] F. Qian, X. Wang, L. Zhang, A. Lin, H. Zhao, E. Fikrig, R.R. Montgomery, Impaired interferon signaling in dendritic cells from older donors infected in vitro with West Nile virus, *J. Infect. Dis.* 203 (2011) 1415–1424.
- [97] Y. Wang, M. Lobigs, E. Lee, A. Müllbacher, CD8 $^+$ T cells mediate recovery and immunopathology in West Nile virus encephalitis, *J. Virol.* 77 (2003) 13323–13334.
- [98] H. Fang, T. Welte, X. Zheng, G.-J.J. Chang, M.R. Holbrook, L. Soong, T. Wang, $\gamma\delta$ T cells promote the maturation of dendritic cells during West Nile virus infection, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 59 (2010) 71–80.
- [99] B. Shrestha, D. Gottlieb, M.S. Diamond, Infection and injury of neurons by West Nile encephalitis virus, *J. Virol.* 77 (2003) 13203–13213.
- [100] F. Bai, K.-F. Kong, J. Dai, F. Qian, L. Zhang, C.R. Brown, E. Fikrig, R.R. Montgomery, A paradoxical role for neutrophils in the pathogenesis of West Nile virus, *J. Infect. Dis.* 202 (2010) 1804–1812.
- [101] A. Rawal, P.J. Gavin, C.D. Sturgis, Cerebrospinal fluid cytology in seasonal epidemic West Nile virus meningo-encephalitis, *Diagn. Cytopathol.* 34 (2006) 127–129.
- [102] K.L. Tyler, J. Pape, R.J. Goody, M. Corkill, B.K. Kleinschmidt-DeMasters, CSF findings in 250 patients with serologically confirmed West Nile virus

- meningitis and encephalitis, *Neurology*. 66 (2006) 361–365.
- [103] E.B. Hayes, J.J. Sejvar, S.R. Zaki, R.S. Lanciotti, A. V Bode, G.L. Campbell, Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease, *Emerg. Infect. Dis.* 11 (2005) 1174.
- [104] J.J. Sejvar, West Nile Virus Infection, in: *Emerg. Infect. 10*, American Society of Microbiology, 2016: pp. 175–199. doi:10.1128/microbiolspec.EI10-0021-2016.
- [105] V. Deubel, L. Fiette, P. Gounon, M.T. Drouet, H. Khun, M. Huerre, C. Banet, M. Malkinson, P. Despres, Variations in biological features of West Nile viruses, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 951 (2001) 195–206.
- [106] T. Wang, T. Town, L. Alexopoulou, J.F. Anderson, E. Fikrig, R.A. Flavell, Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis, *Nat. Med.* 10 (2004) 1366.
- [107] T.J. Chambers, M. Halevy, A. Nestorowicz, C.M. Rice, S. Lustig, West Nile virus envelope proteins: nucleotide sequence analysis of strains differing in mouse neuroinvasiveness., *J. Gen. Virol.* 79 (1998) 2375–2380.
- [108] W.-J. Shieh, J. Guarner, M. Layton, A. Fine, J. Miller, D. Nash, G.L. Campbell, J.T. Roehrig, D.J. Gubler, S.R. Zaki, The role of pathology in an investigation of an outbreak of West Nile encephalitis in New York, 1999., *Emerg. Infect. Dis.* 6 (2000) 370.
- [109] B.A. Sampson, V. Armbrustmacher, West Nile encephalitis: the neuropathology of four fatalities, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 951 (2001) 172–178.
- [110] S.M. Lim, P. Koraka, A.D.M.E. Osterhaus, B.E.E. Martina, West Nile virus: immunity and pathogenesis, *Viruses*. 3 (2011) 811–828.
- [111] S.L. Rossi, T.M. Ross, J.D. Evans, West nile virus, *Clin. Lab. Med.* 30 (2010) 47–65.
- [112] J.T. Watson, P.E. Pertel, R.C. Jones, A.M. Siston, W.S. Paul, C.C. Austin, S.I. Gerber, Clinical characteristics and functional outcomes of West Nile fever, *Ann. Intern. Med.* 141 (2004) 360–365.

- [113] A. Anastasiadou, A. Economopoulou, I. Kakoulidis, R. Zilidou, D. Butel, D. Zorpidou, G. Ferentinos, P. Markou, E. Kougas, A. Papa, Non-neuroinvasive West Nile virus infections during the outbreak in Greece, *Clin. Microbiol. Infect.* 17 (2011) 1681–1683.
- [114] C.M. Southam, A.E. Moore, Clinical studies of viruses as antineoplastic agents, with particular reference to Egypt 101 virus, *Cancer*. 5 (1952) 1025–1034.
- [115] A. Perelman, J. Stern, Acute pancreatitis in West Nile fever, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 23 (1974) 1150–1152.
- [116] H.S. Bains, L.M. Jampol, M.C. Caughron, J.R. Parnell, Vitritis and chorioretinitis in a patient with West Nile virus infection, *Arch. Ophthalmol.* 121 (2003) 205–210.
- [117] P.K. Kaiser, M.S. Lee, D.A. Martin, Occlusive vasculitis in a patient with concomitant West Nile virus infection, *Am. J. Ophthalmol.* 136 (2003) 928–930.
- [118] A. Marka, A. Diamantidis, A. Papa, G. Valiakos, S. Chaintoutis, D. Doukas, P. Tserkezou, A. Giannakopoulos, K. Papaspyropoulos, E. Patsoula, West Nile virus state of the art report of MALWEST Project, *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 10 (2013) 6534–6610.
- [119] S.L. LaDeau, A.M. Kilpatrick, P.P. Marra, West Nile virus emergence and large-scale declines of North American bird populations, *Nature*. 447 (2007) 710.
- [120] N. Komar, S. Langevin, S. Hinten, N. Nemeth, E. Edwards, D. Hettler, B. Davis, R. Bowen, M. Bunning, Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus, *Emerg. Infect. Dis.* (2003). doi:10.3201/eid0903.020628.
- [121] H.M. Weingartl, J.L. Neufeld, J. Copps, P.M. Arszal, Experimental West Nile virus infection in blue jays (*Cyanocitta cristata*) and crows (*Corvus brachyrhynchos*), *Vet. Pathol.* 41 (2004) 362–370.

- [122] K.E. Steele, M.J. Linn, R.J. Schoepp, N. Komar, T.W. Geisbert, R.M. Manduca, P.P. Calle, B.L. Raphael, T.L. Clippinger, T. Larsen, Pathology of fatal West Nile virus infections in native and exotic birds during the 1999 outbreak in New York City, New York, *Vet. Pathol.* 37 (2000) 208–224.
- [123] G. Rossini, F. Carletti, L. Bordi, F. Cavrini, P. Gaibani, M.P. Landini, A. Pierro, M.R. Capobianchi, A. Di Caro, V. Sambri, Phylogenetic analysis of West Nile virus isolates, Italy, 2008–2009, *Emerg. Infect. Dis.* 17 (2011) 903.
- [124] A.B. Sudeep, D. Parashar, R.S. Jadi, A. Basu, C. Mokashi, V.A. Arankalle, A.C. Mishra, Establishment and characterization of a new *Aedes aegypti* (L.)(Diptera: Culicidae) cell line with special emphasis on virus susceptibility, *Vitr. Cell. Dev. Biol.* 45 (2009) 491–495.
- [125] M. Monini, E. Falcone, L. Busani, R. Romi, F.M. Ruggeri, West Nile virus: Characteristics of an African virus adapting to the third millennium world, *Open Virol. J.* 4 (2010) 42.
- [126] J. Castillo-Olivares, J. Wood, West Nile virus infection of horses, *Vet. Res.* 35 (2004) 467–483.
- [127] J. Bhatnagar, J. Guarner, C.D. Paddock, W.-J. Shieh, R.S. Lanciotti, A.A. Marfin, G.L. Campbell, S.R. Zaki, Detection of West Nile virus in formalin-fixed, paraffin-embedded human tissues by RT-PCR: a useful adjunct to conventional tissue-based diagnostic methods, *J. Clin. Virol.* 38 (2007) 106–111.
- [128] R.S. Lanciotti, A.J. Kerst, R.S. Nasci, M.S. Godsey, C.J. Mitchell, H.M. Savage, N. Komar, N.A. Panella, B.C. Allen, K.E. Volpe, Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay, *J. Clin. Microbiol.* 38 (2000) 4066–4071.
- [129] M.A. Jiménez-Clavero, M. Agüero, G. Rojo, C. Gómez-Tejedor, A new fluorogenic real-time RT-PCR assay for detection of lineage 1 and lineage 2 West Nile viruses, *J. Vet. Diagnostic Investig.* 18 (2006) 459–462.
- [130] J.F. Papin, W. Vahrson, D.P. Dittmer, SYBR green-based real-time

- quantitative PCR assay for detection of West Nile Virus circumvents false-negative results due to strain variability, *J. Clin. Microbiol.* 42 (2004) 1511–1518.
- [131] J.F. Papin, W. Vahrson, L. Larson, D.P. Dittmer, Genome-wide real-time PCR for West Nile virus reduces the false-negative rate and facilitates new strain discovery, *J. Virol. Methods.* 169 (2010) 103–111.
- [132] S. Kleinman, S.A. Glynn, M. Busch, D. Todd, L. Powell, L. Pietrelli, G. Nemo, G. Schreiber, C. Bianco, L. Katz, The 2003 West Nile virus United States epidemic: the America's Blood Centers experience, *Transfusion.* 45 (2005) 469–479.
- [133] E.B. Kauffman, S.A. Jones, A.P. Dupuis, K.A. Ngo, K.A. Bernard, L.D. Kramer, Virus detection protocols for West Nile virus in vertebrate and mosquito specimens, *J. Clin. Microbiol.* 41 (2003) 3661–3667.
- [134] S. Rondini, M.R. Pingle, S. Das, R. Tesh, M.S. Rundell, J. Hom, S. Stramer, K. Turner, S.N. Rossmann, R. Lanciotti, Development of multiplex PCR-ligase detection reaction assay for detection of West Nile virus, *J. Clin. Microbiol.* 46 (2008) 2269–2279.
- [135] M. Eiden, A. Vina-Rodriguez, B. Hoffmann, U. Ziegler, M.H. Groschup, Two new real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assays with unique target sites for the specific and sensitive detection of lineages 1 and 2 West Nile virus strains, *J. Vet. Diagnostic Investig.* 22 (2010) 748–753.
- [136] P.-Y. Shi, E.B. Kauffman, P. Ren, A. Felton, J.H. Tai, A.P. Dupuis, S.A. Jones, K.A. Ngo, D.C. Nicholas, J. Maffei, High-throughput detection of West Nile virus RNA, *J. Clin. Microbiol.* 39 (2001) 1264–1271.
- [137] N. Scaramozzino, J.-M. Crance, A. Jouan, D.A. DeBriel, F. Stoll, D. Garin, Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences, *J. Clin. Microbiol.* 39 (2001) 1922–1927.

- [138] M.P. Sánchez-Seco, D. Rosario, C. Domingo, L. Hernández, K. Valdés, M.G. Guzmán, A. Tenorio, Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification, *J. Virol. Methods*. 126 (2005) 101–109.
- [139] J. Hirota, S. Shimizu, T. Shibahara, Application of West Nile virus diagnostic techniques, *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 11 (2013) 793–803.
- [140] OIE, No Title, in: OIE (Ed.), *OIE Terr. Man.*, 2018, 2018: pp. 697–710.
- [141] W.H. Organization, Guidelines for plaque reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses, World Health Organization, 2007.
- [142] A.A. Qureshi, D.W. Trent, Group B Arbovirus Structural and Nonstructural Antigens III. Serological Specificity of Solubilized Intracellular Viral Proteins, *Infect. Immun.* 8 (1973) 993–999.
- [143] H.M. Weingartl, M.A. Drebot, Z. Hubálek, J. Halouzka, M. Andonova, A. Dibernardo, C. Cottam-Birt, J. Larence, P. Marszal, Comparison of assays for the detection of West Nile virus antibodies in chicken serum, *Can. J. Vet. Res.* (2003).
- [144] J. Hobson-Peters, Approaches for the development of rapid serological assays for surveillance and diagnosis of infections caused by zoonotic flaviviruses of the Japanese encephalitis virus serocomplex, *Biomed Res. Int.* 2012 (2012).
- [145] Y. Kitai, M. Shoda, T. Kondo, E. Konishi, Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate West Nile virus from Japanese encephalitis virus infections in equine sera, *Clin. Vaccine Immunol.* 14 (2007) 1024–1031.
- [146] K. Sondgeroth, B. Blitvich, C. Blair, J. Terwee, R. Junge, M. Sauter, S. VandeWoude, Assessing flavivirus, lentivirus, and herpesvirus exposure in free-ranging ring-tailed lemurs in southwestern Madagascar, *J. Wildl. Dis.* 43 (2007) 40–47.
- [147] M.A. Lorono-Pino, J.A. Farfan-Ale, B.J. Blitvich, J.L. Beebe, R.G. Jarman,

- B.J. Beaty, Evaluation of an epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of West Nile virus infections in humans, *Clin. Vaccine Immunol.* 16 (2009) 749–755.
- [148] E. Sotelo, A.V. Gutierrez-Guzmán, J. del Amo, F. Llorente, M. El-Harrak, E. Pérez-Ramírez, J.M. Blanco, U. Höfle, M.A. Jiménez-Clavero, Pathogenicity of two recent Western Mediterranean West Nile virus isolates in a wild bird species indigenous to Southern Europe: the red-legged partridge, *Vet. Res.* 42 (2011) 11.
- [149] B.J. Beaty, C.H. Calisher, R.S. Shope, Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections, pp. 797–856, *Arboviruses. Am. Public Heal. Assoc. Washington, DC.* (1989).
- [150] M.T. Long, W. Jeter, J. Hernandez, D.C. Sellon, D. Gosche, K. Gillis, E. Bille, E.P. Gibbs, Diagnostic performance of the equine IgM capture ELISA for serodiagnosis of West Nile virus infection, *J. Vet. Intern. Med.* 20 (2006) 608–613.
- [151] M. Niedrig, O.D. Mantke, D. Altmann, H. Zeller, First international diagnostic accuracy study for the serological detection of West Nile virus infection, *BMC Infect. Dis.* 7 (2007) 72.
- [152] P. Gaibani, A. Pierro, R. Alicino, G. Rossini, F. Cavrini, M.P. Landini, V. Sambri, Detection of Usutu-virus-specific IgG in blood donors from northern Italy, *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 12 (2012) 431–433.
- [153] M. Niedrig, K. Sonnenberg, K. Steinhagen, J.T. Paweska, Comparison of ELISA and immunoassays for measurement of IgG and IgM antibody to West Nile virus in human sera against virus neutralisation, *J. Virol. Methods.* 139 (2007) 103–105.
- [154] A.T. Peterson, D.A. Vieglais, J.K. Andreasen, Migratory birds modeled as critical transport agents for West Nile virus in North America, *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 3 (2003) 27–37.
- [155] A.-L. Sayao, O. Suchowersky, A. Al-Khathaami, B. Klassen, N.R. Katz, R. Sevick, P. Tilley, J. Fox, D. Patry, Calgary experience with West Nile virus

- neurological syndrome during the late summer of 2003, *Can. J. Neurol. Sci.* 31 (2004) 194–203.
- [156] A.H. Kramer, Viral encephalitis in the ICU, *Crit. Care Clin.* 29 (2013) 621–649.
- [157] J.W. Huggins, Prospects for treatment of viral hemorrhagic fevers with ribavirin, a broad-spectrum antiviral drug, *Rev. Infect. Dis.* 11 (1989) S750–S761.
- [158] I. Jordan, T. Briese, N. Fischer, J.Y.-N. Lau, W.I. Lipkin, Ribavirin inhibits West Nile virus replication and cytopathic effect in neural cells, *J. Infect. Dis.* 182 (2000) 1214–1217.
- [159] J.F. Anderson, J.J. Rahal, Efficacy of interferon α -2b and ribavirin against West Nile virus in vitro, *Emerg. Infect. Dis.* 8 (2002) 107.
- [160] J.D. Morrey, V. Siddharthan, A.L. Olsen, G.Y. Roper, H. Wang, T.J. Baldwin, S. Koenig, S. Johnson, J.L. Nordstrom, M.S. Diamond, Humanized monoclonal antibody against West Nile virus envelope protein administered after neuronal infection protects against lethal encephalitis in hamsters, *J. Infect. Dis.* 194 (2006) 1300–1308.
- [161] A.R. Tunkel, C.A. Glaser, K.C. Bloch, J.J. Sejvar, C.M. Marra, K.L. Roos, B.J. Hartman, S.L. Kaplan, W.M. Scheld, R.J. Whitley, The management of encephalitis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America, *Clin. Infect. Dis.* 47 (2008) 303–327.
- [162] A.C. Jackson, Therapy of West Nile virus infection, *Can. J. Neurol. Sci.* 31 (2004) 131–134.
- [163] A.G. Agrawal, L.R. Petersen, Human immunoglobulin as a treatment for West Nile virus infection, (2003).
- [164] D. Ben-Nathan, O. Gershoni-Yahalom, I. Samina, Y. Khinich, I. Nur, O. Laub, A. Gottreich, M. Simanov, A. Porgador, B. Rager-Zisman, Using high titer West Nile intravenous immunoglobulin from selected Israeli donors for treatment of West Nile virus infection, *BMC Infect. Dis.* 9 (2009) 18.

- [165] D.L. Camenga, N. Nathanson, G.A. Cole, Cyclophosphamide-potentiated West Nile viral encephalitis: relative influence of cellular and humoral factors, *J. Infect. Dis.* 130 (1974) 634–641.
- [166] M. Haley, A.S. Retter, D. Fowler, J. Gea-Banacloche, N.P. O’Grady, The role for intravenous immunoglobulin in the treatment of West Nile virus encephalitis, *Clin. Infect. Dis.* 37 (2003) e88–e90.
- [167] M.E. Levi, D. Quan, J.T. Ho, B.K. Kleinschmidt-DeMasters, K.L. Tyler, T.J. Grazia, Impact of rituximab-associated B-cell defects on West Nile virus meningoencephalitis in solid organ transplant recipients, *Clin. Transplant.* 24 (2010) 223–228.
- [168] T.J. Gray, C.E. Webb, A review of the epidemiological and clinical aspects of West Nile virus, *Int. J. Gen. Med.* 7 (2014) 193.
- [169] A. Steinman, G.A. Sutton, S. Hadar, C. Banet, H. Yadin, A. Brill, Clinical signs of West Nile virus encephalomyelitis in horses during the outbreak in Israel in 2000, *Vet. Rec.* 151 (2002) 47–49.
- [170] A.L. Johnson, Update on infectious diseases affecting the equine nervous system, *Vet. Clin. Equine Pract.* 27 (2011) 573–587.
- [171] S.M. Abutarbush, B.P. O’Connor, C. Clark, F. Sampieri, J.M. Naylor, Clinical West Nile virus infection in 2 horses in western Canada, *Can. Vet. J.* 45 (2004) 315.
- [172] M. Ledizet, K. Kar, H.G. Foellmer, T. Wang, S.L. Bushmich, J.F. Anderson, E. Fikrig, R.A. Koski, A recombinant envelope protein vaccine against West Nile virus, *Vaccine.* 23 (2005) 3915–3924.
- [173] T. Wang, J.F. Anderson, L.A. Magnarelli, S.J. Wong, R.A. Koski, E. Fikrig, Immunization of mice against West Nile virus with recombinant envelope protein, *J. Immunol.* 167 (2001) 5273–5277.
- [174] M.J. Engle, M.S. Diamond, Antibody prophylaxis and therapy against West Nile virus infection in wild-type and immunodeficient mice, *J. Virol.* 77 (2003) 12941–12949.

- [175] M. Ledizet, K. Kar, H.G. Foellmer, N. Bonafé, K.G. Anthony, L.H. Gould, S.L. Bushmich, E. Fikrig, R.A. Koski, Antibodies targeting linear determinants of the envelope protein protect mice against West Nile virus, *J. Infect. Dis.* 196 (2007) 1741–1748.
- [176] Z. Shimoni, M.J. Niven, S. Pitlick, S. Bulvik, Treatment of West Nile virus encephalitis with intravenous immunoglobulin, (2001).
- [177] A. Hamdan, P. Green, E. Mendelson, M.R. Kramer, S. Pitlik, M. Weinberger, Possible benefit of intravenous immunoglobulin therapy in a lung transplant recipient with West Nile virus encephalitis, *Transpl. Infect. Dis.* 4 (2002) 160–162.
- [178] J.A. Kaiser, A.D.T. Barrett, Twenty Years of Progress Toward West Nile Virus Vaccine Development, *Viruses.* 11 (2019) 823.
- [179] F.J. May, C.T. Davis, R.B. Tesh, A.D.T. Barrett, Phylogeography of West Nile Virus : from the Cradle of Evolution in Africa to Eurasia , Australia , and the Americas □ †, 85 (2011) 2964–2974. doi:10.1128/JVI.01963-10.
- [180] F.J. Burt, A.A. Grobbelaar, P.A. Leman, F.S. Anthony, G.V.F. Gibson, R. Swanepoel, Phylogenetic relationships of southern African West Nile virus isolates, *Emerg. Infect. Dis.* 8 (2002) 820.
- [181] Z. Hubálek, J. Halouzka, West Nile fever--a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe., *Emerg. Infect. Dis.* 5 (1999) 643.
- [182] O. Meco, West Nile arbovirus antibodies with hemagglutination inhibition (HI) in residents of Southeast Anatolia, *Mikrobiyol. Bul.* 11 (1977) 3–17.
- [183] K. Naficy, S. Saidi, Serological survey on viral antibodies in Iran., *Trop. Geogr. Med.* 22 (1970) 183–188.
- [184] J.C. Morrill, B.K. Johnson, C. Hyams, F. Okoth, P.M. Tukei, M. Mugambi, J. Woody, Serological evidence of arboviral infections among humans of coastal Kenya., *J. Trop. Med. Hyg.* 94 (1991) 166.
- [185] C.G. Hayes, West Nile virus: Uganda, 1937, to New York City, 1999, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 951 (2001) 25–37.

- [186] G. Dauphin, S. Zientara, H. Zeller, B. Murgue, West Nile: worldwide current situation in animals and humans, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27 (2004) 343–355.
- [187] H. Triki, S. Murri, B. Le Guenno, O. Bahri, K. Hili, M. Sidhom, K. Dellagi, Méningoencéphalite à arbovirus West Nile en Tunisie, *Med Trop.* 61 (2001) 487–490.
- [188] S.E. Randolph, D.J. Rogers, The arrival, establishment and spread of exotic diseases: patterns and predictions, *Nat. Rev. Microbiol.* 8 (2010) 361–371.
- [189] N. Komar, G.G. Clark, West Nile virus activity in Latin America and the Caribbean, *Rev. Panam. Salud Pública.* 19 (2006) 112–117.
- [190] S. David, A.M. Abraham, Epidemiological and clinical aspects on West Nile virus, a globally emerging pathogen, *Infect. Dis. (Auckl).* 48 (2016) 571–586.
- [191] M.J. Frost, J. Zhang, J.H. Edmonds, N.A. Prow, X. Gu, R. Davis, C. Hornitzky, K.E. Arzey, D. Finlaison, P. Hick, Characterization of virulent west nile virus kunjin strain, australia, 2011, *Emerg. Infect. Dis.* 18 (2012) 792.
- [192] A.D.T. Barrett, West Nile in Europe: an increasing public health problem, *J. Travel Med.* 25 (2018) tay096.
- [193] C. Chancey, A. Grinev, E. Volkova, M. Rios, The global ecology and epidemiology of West Nile virus, *Biomed Res. Int.* 2015 (2015).
- [194] G. Fall, N. Di Paola, M. Faye, M. Dia, C.C. de Melo Freire, C. Loucoubar, P.M. de Andrade Zanotto, O. Faye, Biological and phylogenetic characteristics of West African lineages of West Nile virus, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11 (2017) e0006078.
- [195] F.J. May, C.T. Davis, R.B. Tesh, A.D.T. Barrett, Phylogeography of West Nile virus: from the cradle of evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas, *J. Virol.* 85 (2011) 2964–2974.
- [196] R.S. Lanciotti, J.T. Roehrig, V. Deubel, J. Smith, M. Parker, K. Steele, B. Crise, K.E. Volpe, M.B. Crabtree, J.H. Scherret, Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United

- States, *Science* (80-.). 286 (1999) 2333–2337.
- [197] V.P. Bondre, R.S. Jadi, A.C. Mishra, P.N. Yergolkar, V.A. Arankalle, West Nile virus isolates from India: evidence for a distinct genetic lineage, *J. Gen. Virol.* 88 (2007) 875–884.
- [198] T.J. Gray, J.N. Burrow, P.G. Markey, P.I. Whelan, J. Jackson, D.W. Smith, B.J. Currie, West Nile virus (Kunjin subtype) disease in the Northern Territory of Australia—A case of encephalitis and review of all reported cases, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 85 (2011) 952–956.
- [199] R.A. Hall, J.H. Scherret, J.S. Mackenzie, Kunjin virus: an Australian variant of West Nile?, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 951 (2001) 153–160.
- [200] R.S. Lanciotti, G.D. Ebel, V. Deubel, A.J. Kerst, S. Murri, R. Meyer, M. Bowen, N. McKinney, W.E. Morrill, M.B. Crabtree, Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East, *Virology.* 298 (2002) 96–105.
- [201] T. Bakonyi, Z. Hubálek, I. Rudolf, N. Nowotny, Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe, *Emerg. Infect. Dis.* 11 (2005) 225.
- [202] T. Bakonyi, É. Ivanics, K. Erdélyi, K. Ursu, E. Ferenczi, H. Weissenböck, N. Nowotny, Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe, *Emerg. Infect. Dis.* 12 (2006) 618.
- [203] L. Barzon, A. Papa, M. Pacenti, E. Franchin, E. Lavezzo, L. Squarzon, G. Masi, T. Martello, T. Testa, R. Cusinato, Genome sequencing of West Nile Virus from human cases in Greece, 2012, *Viruses.* 5 (2013) 2311–2319.
- [204] F. Magurano, M.E. Remoli, M. Baggieri, C. Fortuna, A. Marchi, C. Fiorentini, P. Bucci, E. Benedetti, M.G. Ciufolini, C. Rizzo, Circulation of West Nile virus lineage 1 and 2 during an outbreak in Italy, *Clin. Microbiol. Infect.* 18 (2012) E545–E547.
- [205] M.T. Aliota, S.A. Jones, A.P. Dupuis, Characterization of Rabensburg virus, a flavivirus closely related to West Nile virus of the Japanese encephalitis

- antigenic group, PLoS One. 7 (2012).
- [206] A. Papa, T. Bakonyi, K. Xanthopoulou, A. Vázquez, A. Tenorio, N. Nowotny, Genetic characterization of West Nile virus lineage 2, Greece, 2010, *Emerg. Infect. Dis.* 17 (2011) 920.
- [207] Z. Hubálek, J. Halouzka, Z. Juricova, O. Sebesta, First isolation of mosquito-borne West Nile virus in the Czech Republic., *Acta Virol.* 42 (1998) 119.
- [208] A. Vázquez, M.P. Sánchez-Seco, S. Ruiz, F. Molero, L. Hernández, J. Moreno, A. Magallanes, C.G. Tejedor, A. Tenorio, Putative new lineage of West Nile virus, Spain, *Emerg. Infect. Dis.* 16 (2010) 549.
- [209] K.N. Pesko, G.D. Ebel, West Nile virus population genetics and evolution, *Infect. Genet. Evol.* 12 (2012) 181–190.
- [210] A. Grinev, S. Daniel, S. Stramer, S. Rossmann, S. Caglioti, M. Rios, Genetic variability of West Nile virus in US blood donors, 2002–2005, *Emerg. Infect. Dis.* 14 (2008) 436.
- [211] L.R. Petersen, A.C. Brault, R.S. Nasci, West Nile virus: review of the literature, *Jama.* 310 (2013) 308–315.
- [212] R.A. Hall, A.K. Broom, D.W. Smith, J.S. Mackenzie, The ecology and epidemiology of Kunjin virus, in: *Japanese Enceph. West Nile Viruses*, Springer, 2002: pp. 253–269.
- [213] S. Baqar, C.G. Hayes, J.R. Murphy, D.M. Watts, Vertical transmission of West Nile virus by *Culex* and *Aedes* species mosquitoes, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48 (1993) 757–762.
- [214] B.R. Miller, R.S. Nasci, M.S. Godsey, H.M. Savage, J.J. Lutwama, R.S. Lanciotti, C.J. Peters, 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.* 62 (2000) 240–246.
- [215] M.J. Turell, M.R. Sardelis, D.J. Dohm, M.L. O'GUINN, Potential North American vectors of west Nile virus, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 951 (2001) 317–324.

- [216] S. Higgs, B.S. Schneider, D.L. Vanlandingham, K.A. Klingler, E.A. Gould, Nonviremic transmission of West Nile virus, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (2005) 8871–8874.
- [217] K.Y. Mumcuoglu, C. Banet-Noach, M. Malkinson, U. Shalom, R. Galun, Argasid ticks as possible vectors of West Nile virus in Israel, *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 5 (2005) 65–71.
- [218] C. Vermeil, J. Lavillaureix, E. Beeb, Sur la conservation et la transmission du virus West Nile par quelques arthropodes., *Bull. La Société Pathol. Exot.* 53 (1960).
- [219] C.H. Lawrie, N.Y. Uzcátegui, E.A. Gould, P.A. Nuttall, Ixodid and argasid tick species and West Nile virus, *Emerg. Infect. Dis.* 10 (2004) 653.
- [220] C. Hannoun, U. Rau, Experimental transmission of certain arboviruses by argas reflexus, *Folia Parasitol.* 17 (1970) 365–366.
- [221] J.F. Anderson, A.J. Main, T.G. Andreadis, S.K. Wikel, C.R. Vossbrinck, Transstadial transfer of West Nile virus by three species of ixodid ticks (Acari: Ixodidae), *J. Med. Entomol.* 40 (2003) 528–533.
- [222] D.K. Lvov, Natural foci of arboviruses in the USSR, *Sov. Med. Rev. Virol. UK Harwood Ac. Publ. GmbH.* 1 (1987) 153–196.
- [223] T.H. Work, H.S. Hurlbut, R.M. Taylor, Indigenous Wild Birds of the Nile Delta as Potential West Nile Virus Circulating Reservoirs¹, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 4 (1955) 872–888.
- [224] D.E. Swayne, J.R. Beck, C.S. Smith, W.-J. Shieh, S.R. Zaki, Fatal encephalitis and myocarditis in young domestic geese (*Anser anser domesticus*) caused by West Nile virus., *Emerg. Infect. Dis.* 7 (2001) 751.
- [225] A.E. Garmendia, H.J. Van Kruiningen, R.A. French, J.F. Anderson, T.G. Andreadis, A. Kumar, A.B. West, Recovery and identification of West Nile virus from a hawk in winter, *J. Clin. Microbiol.* 38 (2000) 3110–3111.
- [226] K.A. Bernard, J.G. Maffei, S.A. Jones, E.B. Kauffman, G. Ebel, A.P. Dupuis 2nd, K.A. Ngo, D.C. Nicholas, D.M. Young, P.-Y. Shi, West Nile virus

- infection in birds and mosquitoes, New York State, 2000., *Emerg. Infect. Dis.* 7 (2001) 679.
- [227] H. Bin, Z. Grossman, S. Pokamunski, M. Malkinson, L. Weiss, P. Duvdevani, C. Banet, Y. Weisman, E. Annis, D. Gandaku, West Nile Fever in Israel 1999-2000: From Geese to Humans, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 951 (2001) 127–142.
- [228] M.L. Bunning, R.A. Bowen, B.C. Cropp, K.G. Sullivan, B.S. Davis, N. Komar, M. Godsey, D. Baker, D.L. Hettler, D.A. Holmes, Experimental infection of horses with West Nile virus, *Emerg. Infect. Dis.* 8 (2002) 380.
- [229] B.J. Blitvich, Transmission dynamics and changing epidemiology of West Nile virus, *Anim. Heal. Res. Rev.* 9 (2008) 71–86.
- [230] M.A. Kostjukov, Z.E. Gordeeva, V.P. Bulychev, N. V Nemova, O.A. Daniyarov, 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).* (1985) 49–50.
- [231] A. Steinman, C. Banet-Noach, L. Simanov, N. Grinfeld, Z. Aizenberg, O. Levi, D. Lahav, M. Malkinson, S. Perk, N.Y. Shpigel, Experimental infection of common garter snakes (*Thamnophis sirtalis*) with West Nile virus, *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 6 (2006) 361–368.
- [232] G.D. Huhn, J.J. Sejvar, S.P. Montgomery, M.S. Dworkin, West Nile virus in the United States: an update on an emerging infectious disease, *Am. Fam. Physician.* 68 (2003) 653–660.
- [233] E. Pilo-Moron, J. Vincent, Y. CORROLLER, Isolation of a West Nile virus from the extreme south of the Algerian Sahara (Djanet)., *Arch. l'Institut Pasteur d'Algérie.* 48 (1970) 181–184.
- [234] S. Benbetka, A. Hachid, K.E. Benallal, C. Benbetka, A. Khaldi, I. Bitam, Z. Harrat, First field evidence infection of *Culex perexiguus* by West Nile virus in Sahara Oasis of Algeria, *J. Vector Borne Dis.* 55 (2018) 305.
- [235] I. Schuffenecker, C.N. Peyrefitte, M. El Harrak, S. Murri, A. Leblond, H.G.

- Zeller, West Nile Virus in Morocco, 2003, *Emerg. Infect. Dis.* (2005). doi:10.3201/eid1102.040817.
- [236] O. Bahri, I. Dhifallah, N.A.-B. Ben, H. Fekih, J. Gargouri, H. Triki, Sero-epidemiological study of West Nile virus circulation in human in Tunisia, *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 104 (2011) 272–276.
- [237] A.-B. Failloux, A. Bouattour, C. Faraj, F. Gunay, N. Haddad, Z. Harrat, E. Jancheska, K. Kanani, M.A. Kenawy, M. Kota, Surveillance of arthropod-borne viruses and their vectors in the Mediterranean and Black Sea regions within the MediLabSecure Network, *Curr. Trop. Med. Reports.* 4 (2017) 27–39.
- [238] N. Komar, D.J. Dohm, M.J. Turell, A. Spielman, Eastern equine encephalitis virus in birds: relative competence of European starlings (*Sturnus vulgaris*)., *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60 (1999) 387–391.
- [239] R.S. Ostfeld, F. Keesing, Biodiversity series: the function of biodiversity in the ecology of vector-borne zoonotic diseases, *Can. J. Zool.* 78 (2000) 2061–2078.
- [240] M.J. Turell, M. O’Guinn, J. Oliver, Potential for New York mosquitoes to transmit West Nile virus., *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62 (2000) 413–414.
- [241] P.P. Marra, S. Griffing, C. Caffrey, M.A. Kilpatrick, R. McLean, C. Brand, E.M.I. Saito, A.P. Dupuis, L. Kramer, R. Novak, West Nile virus and wildlife, *Bioscience.* 54 (2004) 393–402.
- [242] C.C. Lord, C.R. Rutledge, W.J. Tabachnick, Relationships between host viremia and vector susceptibility for arboviruses, *J. Med. Entomol.* 43 (2006) 623–630.
- [243] C.A. Galbraith, T. Jones, J. Kirby, T. Mundkur, A review of migratory bird flyways and priorities for management, Bonn, Ger. UNEP/CMS Secr. (2014).
- [244] E.D.E.L.N.P.O.R. PASERIFORMES, E.N.L.D.E.E. MEDITERRÁNEAS, Nectar exploitation by songbirds at Mediterranean stopover sites, *Ardeola.* 57 (2010) 143–157.

- [245] D. Frisch, A.J. Green, J. Figuerola, High dispersal capacity of a broad spectrum of aquatic invertebrates via waterbirds, *Aquat. Sci.* 69 (2007) 568–574.
- [246] P. Isenmann, A. Moali, *The birds of Algeria-Les oiseaux d'Algérie*. Soc. Etudes Ornithol., France, Muséum Nat, Hist. Nat., Paris. (2000).
- [247] J.H. Rappole, S.R. Derrickson, Z. Hubalek, Migratory birds and spread of West Nile virus in the Western Hemisphere., *Emerg. Infect. Dis.* 6 (2000) 319.
- [248] J. Figuerola, M.A. Jiménez-Clavero, G. Rojo, C. Gómez-Tejedor, R. Soriguer, Prevalence of West Nile virus neutralizing antibodies in colonial aquatic birds in southern Spain, *Avian Pathol.* (2007). doi:10.1080/03079450701332329.
- [249] J. Figuerola, M.A. Jiménez-Clavero, G. López, C. Rubio, R. Soriguer, C. Gómez-Tejedor, A. Tenorio, Size matters: West Nile Virus neutralizing antibodies in resident and migratory birds in Spain, *Vet. Microbiol.* 132 (2008) 39–46.
- [250] M.A. Jiménez-Clavero, E. Sotelo, J. Fernandez-Pinero, F. Llorente, J.M. Blanco, J. Rodriguez-Ramos, E. Perez-Ramirez, U. Höfle, West Nile virus in golden eagles, Spain, 2007, *Emerg. Infect. Dis.* 14 (2008) 1489.
- [251] M. Malkinson, C. Banet, Y. Weisman, S. Pokamunski, R. King, Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks, *Emerg. Infect. Dis.* 8 (2002) 392.
- [252] Z. Hubálek, J. Halouzka, Z. Juřicová, S. Šikutová, I. Rudolf, M. Honza, J. Janková, J. Chytil, F. Marec, J. Sitko, Serologic survey of birds for West Nile flavivirus in southern Moravia (Czech Republic), *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 8 (2008) 659–666.
- [253] E.L. Ludu, A. MiHu-Pintilie, D. Anită, A. Anita, S. Lecollinet, G. Savuta, West Nile virus reemergence in Romania: a serologic survey in host species, *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 14 (2014) 330–337.

- [254] R. Parreira, P. Severino, F. Freitas, J. Piedade, A.P.G. Almeida, A. Esteves, Two distinct introductions of the West Nile virus in Portugal disclosed by phylogenetic analysis of genomic sequences, *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 7 (2007) 344–352.
- [255] L. Svensson, K. Mullarney, D. Zetterström, *Collins bird guide 2nd edition*, *Br. Birds.* 103 (2010) 248–252.
- [256] C.J. Feare, *The starling*, Oxford University Press, 1984.
- [257] E. Pérez-ramírez, F. Llorente, M.Á. Jiménez-clavero, Experimental Infections of Wild Birds with West Nile Virus, (2014) 752–781. doi:10.3390/v6020752.
- [258] B.J. Blitvich, N.L. Marlenee, R.A. Hall, C.H. Calisher, R.A. Bowen, J.T. Roehrig, N. Komar, S.A. Langevin, B.J. Beaty, Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of serum antibodies to West Nile virus in multiple avian species, *J. Clin. Microbiol.* 41 (2003) 1041–1047.
- [259] H. Heinzel, R.S.R. Fitter, J. Parslow, *The Birds of Britain and Europe with North Africa and the Middle East*, Collins London, 1972.
- [260] M. Jozan, R. Evans, R. McLean, R. Hall, B. Tangredi, L. Reed, J. Scott, Detection of West Nile virus infection in birds in the United States by blocking ELISA and immunohistochemistry, *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 3 (2003) 99–110.
- [261] S. Mukherjee, Emerging infectious diseases: epidemiological perspective, *Indian J. Dermatol.* 62 (2017) 459.
- [262] W. Van Bortel, F. Dorleans, J. Rosine, A. Bateau, D. Rousset, S. Matheus, I. Leparç-Goffart, O. Flusin, C.M. Prat, R. Cesaire, Chikungunya outbreak in the Caribbean region, December 2013 to March 2014, and the significance for Europe, *Eurosurveillance.* 19 (2014) 20759.
- [263] N.R. Faria, R. do S. da Silva Azevedo, M.U.G. Kraemer, R. Souza, M.S. Cunha, S.C. Hill, J. Thézé, M.B. Bonsall, T.A. Bowden, I. Rissanen, Zika virus in the Americas: early epidemiological and genetic findings, *Science*

- (80-). 352 (2016) 345–349.
- [264] M.U.G. Kraemer, N.R. Faria, R.C. Reiner Jr, N. Golding, B. Nikolay, S. Stasse, M.A. Johansson, H. Salje, O. Faye, G.R.W. Wint, Spread of yellow fever virus outbreak in Angola and the Democratic Republic of the Congo 2015–16: a modelling study, *Lancet Infect. Dis.* 17 (2017) 330–338.
- [265] C.M. Gossner, J.M. Haussig, C. de B. de Saint Lary, K.K. Aaslav, P. Schlagenhauf, B. Sudre, Increased risk of yellow fever infections among unvaccinated European travellers due to ongoing outbreak in Brazil, July 2017 to March 2018, *Eurosurveillance.* 23 (2018).
- [266] L. Barzon, Ongoing and emerging arbovirus threats in Europe, *J. Clin. Virol.* 107 (2018) 38–47.
- [267] H.G. Zeller, B. Murgue, Rôle des oiseaux migrateurs dans l'épidémiologie du virus West Nile, *Médecine Mal. Infect.* 31 (2001) 168–174.
- [268] G.A. Wobeser, Investigation and management of disease in wild animals, Springer Science & Business Media, 2013.
- [269] F. Llorente, A. García-Irazábal, E. Pérez-Ramírez, C. Cano-Gómez, M. Sarasa, A. Vázquez, M.Á. Jiménez-Clavero, Influence of flavivirus co-circulation in serological diagnostics and surveillance: a model of study using West Nile, Usutu and Bagaza viruses, *Transbound. Emerg. Dis.* (2019).
- [270] H.G. Zeller, I. Schuffenecker, 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.* (2004). doi:10.1007/s10096-003-1085-1.
- [271] S. Eybpoosh, M.F. Id, V.B. Id, H. Pouriayevali, F. Sadeghi, A.A. Vasmehjani, Epidemiology of West Nile Virus in the Eastern Mediterranean region : A systematic review, (2019).
- [272] T. Ayadi, A. Hammouda, A. Poux, T. Boulinier, S. Lecollinet, Evidence of exposure of laughing doves (*Spilopelia senegalensis*) to West Nile and

- Usutu viruses in southern Tunisian oases, (2017). doi:10.1017/S0950268817001789.
- [273] S.C. Barros, F. Ramos, T. Fagulha, M. Duarte, M. Henriques, T. Luís, M. Fevereiro, Serological evidence of West Nile virus circulation in Portugal, *Vet. Microbiol.* 152 (2011) 407–410.
- [274] I.V. Llopis, L. Rossi, A. Di Gennaro, A. Mosca, L. Teodori, L. Tomassone, E. Grego, F. Monaco, A. Lorusso, G. Savini, Further circulation of West Nile and Usutu viruses in wild birds in Italy, *Infect. Genet. Evol.* (2015). doi:10.1016/j.meegid.2015.03.024.
- [275] T. Ayadi, A. Hammouda, C. Beck, T. Boulinier, S. Lecollinet, S. Selmi, Flaviviruses in migratory passerines during spring stopover in a desert oasis, *Zoonoses Public Health.* (2019).
- [276] E. Wodak, S. Richter, Z. Bagó, S. Revilla-Fernández, H. Weissenböck, N. Nowotny, P. Winter, Detection and molecular analysis of West Nile virus infections in birds of prey in the eastern part of Austria in 2008 and 2009, *Vet. Microbiol.* 149 (2011) 358–366.
- [277] L.A. Diaz, N. Komar, A. Visintin, M.J.D. Juri, M. Stein, R.L. Allende, L. Spinsanti, B. Konigheim, J. Aguilar, M. Laurito, West Nile virus in birds, Argentina, *Emerg. Infect. Dis.* 14 (2008) 689.
- [278] R. Bargaoui, S. Lecollinet, R. Lancelot, Mapping the Serological Prevalence Rate of West Nile fever in Equids, Tunisia, *Transbound. Emerg. Dis.* 62 (2015) 55–66. doi:10.1111/tbed.12077.
- [279] G. López, M.A. Jiménez-Clavero, A. Vázquez, R. Soriguer, C. Gómez-Tejedor, A. Tenorio, J. Figuerola, Incidence of West Nile virus in birds arriving in wildlife rehabilitation centers in southern Spain, *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 11 (2011) 285–290.
- [280] N. Mishra, S. Kalaiyarasu, S. Nagarajan, M.V.S. Rao, A. George, R. Sridevi, S.P. Behera, S.C. Dubey, T. McCracken, S.H. Newman, Serological evidence of West Nile virus infection in wild migratory and resident water birds in Eastern and Northern India, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*

- 35 (2012) 591–598.
- [281] C.B. Russell, F.F. Hunter, Attraction of *Culex pipiens/restuans* (Diptera: Culicidae) mosquitoes to bird uropygial gland odors at two elevations in the Niagara region of Ontario, *J. Med. Entomol.* 42 (2005) 301–305.
- [282] T.W. Scott, J.D. Edman, J.E. Loye, M. Zult, *Bird-Parasite Interactions: ecology, evolution and behavior*, (1991).
- [283] R. Lelli, P. Calistri, R. Bruno, F. Monaco, G. Savini, D. Di Sabatino, I. Corsi, I. Pascucci, West Nile transmission in resident birds in Italy, *Transbound. Emerg. Dis.* 59 (2012) 421–428.
- [284] R. Bargaoui, S. Lecollinet, R. Lancelot, Mapping the serological prevalence rate of West Nile fever in equids, Tunisia., *Transbound. Emerg. Dis.* 62 (2015) 55–66. doi:10.1111/tbed.12077.
- [285] L. Gangoso, J.M. Grande, F. Llorente, M.Á. Jiménez-Clavero, J.M. Pérez, J. Figuerola, Prevalence of neutralizing antibodies to West Nile virus in Eleonora's Falcons in the Canary Islands, *J. Wildl. Dis.* 46 (2010) 1321–1324.
- [286] A. Hammouda, S. Lecollinet, F. Hamza, I. Nasri, A. Neb, S. Selmi, Exposure of resident sparrows to West Nile virus evidenced in South Tunisia, *Epidemiol. Infect.* 143 (2015) 3546–3549.
- [287] N.D. Burkett-Cadena, A.M. Bingham, T.R. Unnasch, Sex-biased avian host use by arbovirus vectors, *R. Soc. Open Sci.* 1 (2014) 140262.
- [288] B.L. Travi, Y. Osorio, P.C. Melby, B. Chandrasekar, L. Arteaga, N.G. Saravia, Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp., *Infect. Immun.* 70 (2002) 2288–2296.
- [289] M.R. Evans, A.R. Goldsmith, S.R.A. Norris, The effects of testosterone on antibody production and plumage coloration in male house sparrows (*Passer domesticus*), *Behav. Ecol. Sociobiol.* 47 (2000) 156–163.
- [290] T. Ben Hassine, F. De Massis, P. Calistri, G. Savini, B. BelHaj Mohamed, A.

Ranen, A. Di Gennaro, S. Sghaier, S. Hammami, First detection of co-circulation of West Nile and Usutu viruses in equids in the south-west of Tunisia, *Transbound. Emerg. Dis.* 61 (2014) 385–389.

- [291] H. Weissenböck, T. Bakonyi, G. Rossi, P. Mani, N. Nowotny, Usutu virus, Italy, 1996, *Emerg. Infect. Dis.* (2013). doi:10.3201/eid1902.121191.
- [292] N. Becker, H. Jöst, U. Ziegler, M. Eiden, D. Höper, P. Emmerich, E. Fichet-Calvet, D.U. Ehichioya, C. Czajka, M. Gabriel, B. Hoffmann, M. Beer, K. Tenner-Racz, P. Racz, S. Günther, M. Wink, S. Bosch, A. Konrad, M. Pfeffer, M.H. Groschup, J. Schmidt-Chanasit, Epizootic emergence of Usutu virus in wild and captive birds in Germany, *PLoS One.* (2012). doi:10.1371/journal.pone.0032604.

Annexes



First serological evidence of West Nile virus infection in wild birds in Northern Algeria



Bachir Medrouh^{a,b}, Ismail Lafri^{a,c,*}, Cécile Beck^d, Hamza Leulmi^e, Madjid Akkou^a, Lynda Abbad^f, Mohamed Lafri^{a,c}, Idir Bitam^{b,g}, Sylvie Lecollinet^d

^a Institut des sciences vétérinaires, Université Blida 1, Blida, Algeria

^b Laboratoire Biodiversité et Environnement: Interaction, Génomes, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, Alger, Algeria

^c Laboratoire des Biotechnologies Liées à la Reproduction Animale (LBRA), Université Blida 1, Blida, Algeria

^d UMR1161 Virologie, INRAE, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, ANSES, Université Paris-Est, Maisons-Alfort, Paris, France

^e Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Blida 1, Blida, Algeria

^f Département Biomédical, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Algeria

^g Ecole Supérieure en Sciences de l'Aliment et des Industries Agro-Alimentaires, Alger, Algeria

ARTICLE INFO

Keywords:

Algeria
Prevalence
Serology
Usutu virus
West Nile virus
Wild bird

ABSTRACT

While the epidemiology of Flaviviruses has been extensively studied in most of the Mediterranean basin, little is known about the current situation in Algeria. In order to detect the circulation of West Nile (WNV) and Usutu viruses (USUV) in Kabylia, 165 sera were collected from two wild birds species, namely the long distance migrant *Turdus philomelos* (song thrush) (n = 92) and the resident *Passer domesticus* (house sparrow) (n = 73). A total of 154 sera were first analyzed by commercial competition ELISA. WNV and USUV micro-neutralization tests were performed on all c-ELISA positive sera and all samples with poor volume. Overall, 7.8 % (CI95 %: 3.5–11.9) were positive by c-ELISA. Positive results were detected in 12.5 % (CI95 %: 5.6–19.4) of song thrushes and 1.5 % (CI95 %: 0.0–4.5) for sparrow.

Micro-neutralization tests revealed an overall seroprevalence of 6.7 % for WNV (CI95 %: 2.9–10.3). Neutralizing antibodies were found in 8.7 % (CI95 %: 3.0–14.4) for song thrushes and in 4.1 % (CI95 %: 0.0–8.7) of sparrows. The current study demonstrates significant seroprevalence of WNV antibodies in wild birds in Algeria.

1. Introduction

West Nile virus (WNV) and Usutu virus (USUV) are two arboviruses belonging to the genus *Flavivirus* (*Flaviviridae* family), and the Japanese encephalitis virus serocomplex [1]. Both viruses are maintained in the environment in an enzootic transmission cycle that involves ornithophilic mosquitoes mainly of the genus *Culex* as vectors and birds acting as amplifying hosts [2]. Humans, horses and most other mammals are accidental hosts unable to develop viremia sufficient to reinfect naive mosquitoes and are considered dead-end hosts [3].

West Nile virus was initially isolated in Uganda, in 1937 from a woman with pyrexia [4]. The virus can cause a febrile syndrome in humans and approximately 1 % of cases develop severe neurological forms [5]. Until the late 1980s, WNV epidemics were sporadic, occurred in some African countries and neurological forms were exceptional [5]. Since the 1990s, WNV epidemiology has dramatically

changed, with more serious WNV epidemics associated with enhanced frequency of neurological forms, such as in Algeria in 1994 [6], Romania in 1996 [7], Morocco in 1996 [8], Tunisia in 1997 [9], the United States of America in 1999 [10] and Greece in 2010 [11]. Therefore, WNV has become a major public and animal health problem, in Europe and the Mediterranean basin [12].

In very rare occasions, USUV causes in humans symptoms varying from moderate (*i.e.* rash, fever, and headache) to severe signs of infection (*i.e.* neurological disorders) [13]. This African arbovirus is highly pathogenic to certain bird species, particularly passeriforms (*e.g.* *Turdus* spp.) and strigiforms (*e.g.* Great grey owls, *Strix nebulosa*) [14], causing encephalitis, myocarditis and hepatitis in birds [15]. It was first detected in South Africa in 1959 in a *Culex neavei* mosquito [16]. Since then it has been isolated in Senegal, Central African Republic, Burkina Faso, Ivory Coast, Nigeria and Uganda [17]. USUV antibodies have been detected in wild birds [18], dogs and horses [19] in Morocco and

* Corresponding author at: Institut des sciences vétérinaires, Université Blida 1, Blida, Algeria.

E-mail address: lafrismail@gmail.com (I. Lafri).

in birds [20] and horses [21] recently in Tunisia. In Europe, different migratory wild bird species are considered responsible for USUV introduction from Africa [13]. The virus was already circulating in the 1990s, as suggested by a retrospective analysis of archived tissue samples from dead Eurasian blackbird (*Turdus merula*) in Tuscany (Italy) [22]. In 2001, the emergence of the virus was confirmed in Austria and since then the virus has been isolated in 10 countries (Austria, Belgium, Czech Republic, Germany, Italy, Serbia, Spain, Switzerland, France and Hungary); USUV antibodies have been detected, in Croatia, Hungary, Poland, Greece and Slovakia [23].

In Algeria, the global epidemiologic situation of West Nile disease in Algeria, with an updated situation based on human cases, equine reports and entomologic investigations are presented in a comprehensive overview published by Lafri et al. [24]. Despite these scientific reports, data about circulation of WNV in Algeria remain scarce, according to the active circulation of the virus in the Mediterranean basin. As regards USUV, to our knowledge, there is no data available about the circulation of this virus in Algeria.

Passerines are considered as the main competent hosts for WNV and USUV [23]. They generally develop a viremia greater than 10^4 PFU/mL capable of infecting *Culex* vectors, although the level of viremia depends on the bird species and virus strain [25]. Several passeriform species migrate south to Algeria to spend the winter. For these reasons, virological surveillance of wild passerines in wintering grounds such as Kabylia, where this study was carried out, offer very relevant data about the epidemiology of the virus in the region. In this study, we determined the seroprevalence of WNV and USUV antibodies in two wild bird passerine species, either migratory or resident, in order to assess if these viruses circulate in the region.

2. Materials and methods

2.1. Study area

The region of Kabylia is located on the central coast of Algeria, and covers different ecosystems in an area of 31.609 km². The capture sites are focused in 3 wilayas, namely: Tizi-Ouzou (36°43'00"N 4°03'00"E), Béjaïa (36°45'00"N 5°04'00"E) and Bouira (36°22'00"N 3°53'00"E). This mountainous region with a Mediterranean climate is characterized by an average rainfall of 600 mm–1000 mm per year, and an average annual temperature of 18 °C in the littoral, and 25 °C in the inner Wilayas. Agriculture, particularly arboriculture is the main activity of the populations living in Kabylia (Fig. 1).

2.2. Study species

The house sparrow or *Passer domesticus* species belongs to the *Passeridae* family. Originally located in Eurasia, North Africa and Middle East, they were then introduced in many other countries. This familiar bird is very common and widespread. Sparrow is a sedentary bird, lives very close to humans in rural and urban areas [26].

The song thrush or *Turdus philomelos* is a species that belongs to the *Turdidae* family. This common and repleated bird is widespread in Europe, North Africa, Middle East and Asia, and was also introduced in Australia and New Zealand [26]. The song thrush occupies a wide variety of wooded habitats. The most northern populations of this species, particularly first-year birds, spend the winter in the Canary Islands, Morocco, Algeria, Tunisia, Libya and Cyprus [27]. Many birds of this species, from Great Britain and Ireland, are probably wintering in Algeria.

2.3. Ethics statements

The study was carried out in accordance with Algerian legislation guidelines. Permission for capturing, handling and sampling of wild birds from Kabylia was obtained from the ethical committee of General

Directorate of Forests at the Ministry of Agriculture, Rural Development and Fisheries. Only the sex of sparrows could be determined upon capture, based on plumage differences between males and females [26]. After handling, birds are released back into the wild.

2.4. Capture and sampling of birds

From November 2014 to February 2015, sparrow and thrush birds were captured using Japanese nets, to determine their infection status by WNV and USUV. Blood was collected in dry tubes and individually marked. The quantity varied between 0.5–1.5 mL. The blood was immediately centrifuged (for 3 min at 3000 g). The sera were recovered and stored at –20 °C until use. After sampling each captured bird was ringed in order to avoid taking it a second time.

2.5. Laboratory analysis

The laboratory analyses were conducted at the ANSES UMR 1161 Virology unit (France). A first screening was conducted using a competitive enzyme-linked immuno-sorbent assay (c-ELISA) to detect antibodies against the structural envelope (E) protein of WNV (ID Screen® West Nile competition Multi-Species, IDvet, Montpellier, France). The assays was performed and interpreted according to manufacturer's instructions; a serum sample was considered positive if the residual binding ratio (S/N%) was equal or lower than 40 % and doubtful between 40 and 50 %. Due to numerous cross-reactions with other *Flaviviridae*, particularly those of the Japanese encephalitis serocomplex [28]; All ELISA positive sera were subjected to a confirmatory test, the serum-neutralization assay Microneutralization test (MNTs) were performed as follows: sera of birds heat-inactivated at 56 °C for 30 min, were serially diluted (dilution factor of 2, 1/5 to 1/320) and mixed with a volume of 50 µL of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 100 tissue culture infectious dose 50 of WNV strain IS-89-ST1 or USUV strain It2012, 206795-3 (kindly provided by Institut Pasteur, Paris (France) and IZSLER, Brescia (Italy), respectively). After incubation at 37 °C for 1.5 h, 2×10^4 Vero cells in 100 µL of DMEM were added to each well (Vero cells provided by Institut Pasteur, Paris (France)). Then, 96-well plates were incubated at 37 °C for three days. Microscopic reading was performed to visualize the cytopathogenic effects induced after contact of Vero cells and viruses. MNT was considered positive if cells were protected at the 1/10 serum dilution; its neutralization titer was calculated as the inverse of the latest dilution at which cells were protected.

Due to serological cross-reactivity induced by viruses of the Japanese *Flavivirus* serocomplex (*i.e.* WNV and USUV), the results of MNTs were interpreted as follows: (1) if the serum was positive for only one *Flavivirus* or if at least a fourfold difference in titers was observed, the serum was classified according to the highest positive serum titer; (2) for differences in antibody titer less than fourfold, the virus was not determined.

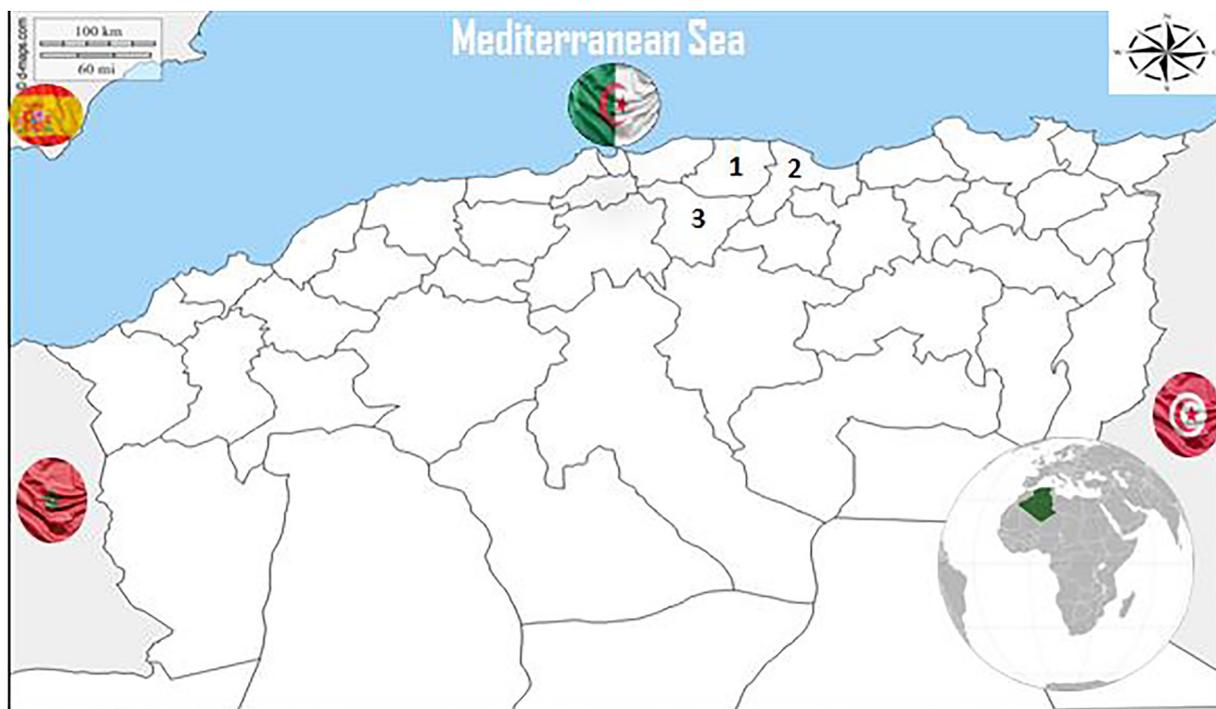
2.6. Statistical analysis

Results of the serological tests were used to estimate the prevalence (95 % CI) of WNV and USUV antibodies. The comparison of seroprevalences was performed by the chi-square test or the Fisher exact test ($\alpha = 5 \%$) using Statistica (StatSoft®) version 6 software. The differences were considered statistically significant when p value was less than 0.05 ($p \leq 0.05$).

3. Results

3.1. C-ELISA screening

A total of 165 birds, including 92 thrushes and 73 sparrows (40 females and 33 males), were captured during the study period. 154 sera



Legend

- 1: Tizi-Ouzou**
- 2: Bejaia**
- 3: Bouira**

Fig. 1. Map of Northern Algeria showing the location of the study area.

Table 1
c-ELISA based seroprevalence of *Flavivirus* (WNV and USUV) for wild birds captured in Kabylia.

Species	Total	<i>Turdus philomelos</i>	<i>Passer domesticus</i>		
			Total	Male	Female
No. Captured	165	92	73	33	40
No. untested	11	4	7	6	1
No. tested by c-ELISA	154	88	66	27	39
No. of positives with c-ELISA	12	11	1	1	0
Positivity c-ELISA (%)	7.7 (± 4.2)	12.5 (± 6.9)	1.5 (± 3)	3.7	0

were tested by c-ELISA and the rest of samples (with low volume) were only analysed by MNT. Using c-ELISA, antibodies against Flaviviruses (WNV, USUV and others) were detected in 7.8 % (95 % CI: 3.5–11.9 %) of tested birds (12/154) corresponding to 12.5 % (5.6–19.4 %) of thrushes and 1.5 % (0.0–4.5 %) of sparrows (Table 1).

3.2. Micro-neutralization testing

Twelve c-ELISA positive sera, one doubtful and eleven sera with insufficient volume and untested by c-ELISA were subjected to MNT. Out of the 24 tested samples, 11 were WNV positive (6.6 %, 95 % CI 2.9–10.3 %) with antibody titers ranging between 1:10 and 1:40, four sera had antibody titers of 1:10, two sera with antibody titers of 1:20 and finally five sera with antibody titers of 1:40. In two samples the specific antibodies could not be determined due to the inconclusive results of the MNTs (2 sera with antibody titers of 1:20 for USUV and 1:40 for WNV). Finally three c-ELISA low positive or doubtful sera and

eight sera not tested by c-ELISA were found negative by MNT. From the migratory status standpoint, MNTs showed 8.7 % (95 % CI: 3.0–14.4 %) and 4.1 % (95 % CI: 0.0–8.7 %) of WNV seropositivity for the migratory and sedentary species, respectively. No significant difference was established between sex of sparrow and the occurrence of Anti-WNV antibodies (p = 0.4456). No bird was found to be positive for USUV virus (Table 2). No statistically significant differences in WNV seroprevalence in the two bird species could be demonstrated (p = 0.2408).

Table 2
Micro-neutralization test based seroprevalence of WNV and USUV for wild birds captured in Kabylia.

Species	Total	<i>Turdus philomelos</i>	<i>Passer domesticus</i>		
			Total	Male	Female
No. Captured	165	92	73	33	40
No. tested by MNTs	24	16	8	7	1
No. MNTs WNV positive	11	8	3	2	1
MNTs WNV positive (%)	6.6 (± 4.3)	8.7 (± 5.7)	4.1 (± 4.6)	6	2.5
No. MNTs undetermined <i>Flavivirus</i>	5 ^a	5	0	0	0

^a MNT undetermined *Flavivirus* corresponds to c-ELISA-positive or doubtful sera that were inconclusive in MNT assay (3 samples) and MNT serum positive for WNV and USUV with a difference less than fourfold in neutralizing antibody titers (2 samples).

4. Discussion

This study confirms for the first time the exposure of wild birds to WNV in the Kabylia region of Algeria. Our results showed an overall seroprevalence of 6.6 %, which represents 8.7 % of song thrushes (*Turdus philomelos*) and 4.1 % of sparrows (*Passer domesticus*). Two sera were positive for both WNV and USUV with similar neutralizing titers and the possibility of WNV and USUV co-infections cannot be totally excluded. We were not able to identify USUV-positive birds; if USUV circulation exists in the region, it seems to be at a low level. Our results are similar to those obtained in a recent study conducted in Southern Tunisia, where a WNV seroprevalence of 9.7 % was reported in resident laughing doves (*Spilopelia senegalensis*) [20]. However, other studies in different migrating birds in several oases of Tunisia, that are hotspots with exceptional wild bird diversity, reported higher WNV seroprevalence rates, between 13 and 58 % depending on the avian species [29]. Prevalences in our study were also consistent with the ones reported in wild bird species by Llopis et al. in Italy (4.29 %, n = 297) [30] and by Chevalier et al. in Southern Senegal (5.5 %, n = 422) [31], two countries with endemic and sustained circulation of *Culex*-borne Flaviviruses. Our results showed a circulation of WNV in Northern Algeria, the rates obtained in this study could be explained by the endemic nature of WNV in the Mediterranean basin [12]. WNV has been reported repeatedly in neighboring countries: in Tunisia [20,21,32,33] and Morocco [34]. Our results corroborated WNV recent seroprevalence data reported in Algeria by Lafri et al. (2017) who evidenced a prevalence of 17.4 % in equids in Eastern Algeria [35].

Despite the endemic nature of USUV in Africa [17], all birds were negative for this latter arbovirus. The absence of detection of anti-USUV antibodies should be interpreted with great caution, given the difficulty of detecting the infection of this virus with the currently available diagnostic tools (ELISA and MNT), especially when co-infection with WNV [30]. It should also be noted that passerines are highly vulnerable to USUV infection, which leads to very high mortality rates [13] and further complicates USUV surveillance. In our study only 2 bird species are included: *Turdus philomelos* migratory species and *Passer domesticus* a sedentary bird with 165 samples which constitutes a bias for the detection of this arbovirus in the study area. Our results are different from those reported by Ayadi et al. (2019), with a prevalence of 1 % in passerines in Tunisian desert oasis (2 Garden warbler were positive for USUV) [29]. Wider surveys on different sedentary species of birds with higher sample size and mosquito catches are required for characterization of USUV epidemiology within birds living in Algeria. To our knowledge, this study remains the first evidence of WNV circulation in wild birds in Northern Algeria. Higher seroprevalence was evidenced in migrating birds, but our study did not allow to infer where (breeding, stopover or hibernation sites) and when the infection occurred. Migratory birds can play a key role in virus introduction; and therefore more *Flavivirus* surveillance studies in migrating birds from Algeria and other neighboring countries are required to evaluate the virus spread and the risk of re-emergence in the Mediterranean basin.

In Algeria, clinical outbreaks of WNV and USUV in birds or horses have not been reported. In humans, since the outbreak of 1994 at Timimoune in Southeastern Algeria, only one case was confirmed in September 2012 in Jijel (Episouth weekly Epi Bull, 2012, Leparco-Goffart I. Personal communication). Conversely, several recent outbreaks and epizootics of WNV have been reported in Tunisia [33] and Morocco [34]. This difference could be due to several factors, as for example a potential lower pathogenicity of WNV circulating strains in Algeria than those isolated in Morocco (96–111) or Tunisia (PaH001) [36]. The absence of an active surveillance system and the lack of recent WNV or USUV isolates in Algeria make it difficult to confirm this hypothesis. We believe that WNV or USUV cases in humans and/or animals go unnoticed and that the disease is poorly known and probably underestimated.

5. Conclusion

In conclusion, this survey confirmed for the first time, WNV circulation in wild birds captured in Northern Algeria. WNV and USUV are zoonotic pathogens that can cause neurological diseases in humans. Hence, it is important that the current WNV surveillance program in Algeria considers other Flaviviruses, such as USUV. Wider surveys on different sedentary species of birds, as well as vectors and reinforced surveillance of human infections are required for the characterization of WNV and USUV epidemiology in Algeria. Finally, phylogenetic studies would help to determine the origin of strains circulating in Algeria in order to better control *Flavivirus* infections.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgements

We thank the General Directorate of Forests for permission to capture wild birds. We also thank Dr. Salah Agag and Dr. Sofiane Tahrikt for their contribution to this study. We would like to acknowledge Steeve Lowenski and Marine Dumarest, UMR1161 Virology at ANSES Animal Health Laboratory for the processing and analysis of the samples.

References

- [1] M.H.V. Van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle, Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses, Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Academic Press, 2000.
- [2] S.M. Lim, M. Geervliet, J.H. Verhagen, G.J.D.M. Müskens, F.A. Majoor, A.D.M.E. Osterhaus, B.E.E. Martina, Serologic Evidence of West Nile Virus and Usutu Virus Infections in Eurasian Coots in the Netherlands, *Zoonoses Public Health*, 2018.
- [3] S. Pradier, S. Lecollinet, A. Leblond, West Nile Virus Epidemiology and Factors Disease Transmission and Epidemiology 31 (2012), pp. 829–844.
- [4] K.C. Smithburn, T.P. Hughes, A.W. Burke, J.H. Paul, A Neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* s1-20 (4) (1940) 471–492 1 Jul 1940.
- [5] L.D. Kramer, J. Li, P. Shi, Kramer, West Nile virus, *Lancet Neurol.* (2007) 1999–2005.
- [6] B. Le Guenno, A. Bougermouh, T. Azzam, R. Bouakaz, West Nile: a deadly virus? *Lancet* 348 (1996) 1315.
- [7] T.F. Tsai, F. Popovici, C. Cernescu, G.L. Campbell, N.I. Nedelcu, West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania, *Lancet* 352 (9130) (1998) 767–771.
- [8] A. Tber, West Nile fever in horses in Morocco, *Bull. OIE* 11 (1996) 869–887.
- [9] H. Triki, S. Murri, B. Le Guenno, West Nile viral meningo-encephalitis in Tunisia, *Med. Trop.* 61 (2001) 487–490.
- [10] D.S. Asnis, R. Conetta, G. Waldman, A.A. Teixeira, The West Nile virus encephalitis outbreak in the United States (1999–2000): from Flushing, New York, to beyond its borders, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (2001) 161–171.
- [11] K. Danis, A. Papa, G. Theocharopoulos, G. Dougas, M. Athanasiou, M. Detsis, A. Baka, T. Lytras, K. Mellou, S. Bonovas, Outbreak of West Nile virus infection in Greece, 2010, *Emerg. Infect. Dis* 17 (2011) 1868–1872.
- [12] E. Holt, West Nile virus spreads in Europe, *Lancet Infect. Dis.* (2018) 1184.
- [13] P. Gaibani, G. Rossini, An overview of Usutu virus, *Microbes Infect.* 19 (7–8) (2017) 382–387.
- [14] N. Becker, H. Jöst, U. Ziegler, M. Eiden, D. Höper, P. Emmerich, E. Fichet-Calvet, D.U. Ehichioya, C. Czajka, M. Gabriel, B. Hoffmann, M. Beer, K. Tenner-Racz, P. Racz, S. Günther, M. Wink, S. Bosch, A. Konrad, M. Pfeffer, M.H. Groschup, J. Schmidt-Chanasit, Epizootic emergence of Usutu virus in wild and captive birds in Germany, *PLoS One* 7 (2012) e32604.
- [15] M. Clé, C. Beck, S. Salinas, S. Lecollinet, S. Gutierrez, P. Van de Perre, T. Baldet, V. Foulongne, Y. Simonin, Usutu virus: a new threat? *Epidemiol. Infect.* 147 (2019).
- [16] M.C. Williams, D.J.H. Simpson, A.J. Haddow, E.M. Knight, The isolation of West Nile virus from man and of Usutu virus from the bird-biting mosquito *Mansonia aurites* (Theobald) in the Entebbe area of Uganda, *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 58 (1964) 367–374.
- [17] B. Nikolay, M. Diallo, C.S.B. Boye, A.A. Sall, Usutu virus in Africa, *Vector-Borne Zoonotic Dis* 11 (11) (2011) 1417–1423.
- [18] J. Figueroa, R.E. Baouab, R. Soriguier, O. Fassi-Fihri, F. Llorente, M.A. Jiménez-Clavero, West Nile virus antibodies in wild birds, Morocco, 2008, *Emerg. Infect. Dis.* 15 (10) (2009) 1651–1653.
- [19] B. Durand, H. Haskouri, S. Lowenski, N. Vachieri, C. Beck, Seroprevalence of West Nile and Usutu Viruses in Military Working Horses and Dogs, Morocco, 2012: Dog

- as an Alternative WNV Sentinel Species? (2016), pp. 1857–1864.
- [20] T. Ayadi, A. Hammouda, A. Poux, T. Boulinier, S. Lecollinet, Evidence of Exposure of Laughing Doves (*Spilopelia senegalensis*) to West Nile and Usutu Viruses in Southern Tunisian Oases, (2017).
- [21] T. Ben Hassine, S. Hammami, H. Elghoul, A. Ghram, Détection de la circulation de virus West Nile chez les Équidés dans le nord-ouest de la Tunisie, *Bull. La Soc. Pathol. Exot.* 99 (2) (2011) 119–121.
- [22] H. Weissenböck, T. Bakonyi, G. Rossi, P. Mani, N. Nowotny, Usutu virus, Italy, 1996, *Emerg. Infect. Dis.* 19 (2) (2013) 274–277.
- [23] M. Clé, S. Salinas, S. Lecollinet, C. Beck, S. Gutierrez, T. Baldet, P. Vande Perre, V. Foulongne, Y. Simonin, L. Usutu, Le virus Usutu: la menace fantôme, *Med. Sci.* 34 (2018) 709–716.
- [24] I. Lafri, A. Hachid, I. Bitam, West Nile virus in Algeria: a comprehensive overview, *New Microbes New Infect.* 27 (2018) 9–13.
- [25] E. Pérez-Ramírez, F. Llorente, M.Á. Jiménez-Clavero, Experimental infections of wild birds with West Nile virus, *Viruses* 6 (2) (2014) 752–781.
- [26] L. Svensson, K. Mullarney, D. Zetterström, 2nd edition, *Collins Bird Guide* 103 (2010), pp. 248–252.
- [27] C.V. Wernham, M.P. Toms, J.H. Marchant, J.A. Clark, G.M. Siriwardena, S.R. Baillie, *The Migration Atlas: Movements of the Birds of Britain and Ireland*, T. A.D. Poyser, 2002.
- [28] C. Beck, S. Lowenski, B. Durand, C. Bahuon, S. Zientara, S. Lecollinet, Improved reliability of serological tools for the diagnosis of West Nile fever in horses within Europe, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 17 (2017) 662–664.
- [29] T. Ayadi, A. Hammouda, C. Beck, T. Boulinier, S. Lecollinet, S. Selmi, Flaviviruses in Migratory Passerines During Spring Stopover in a Desert Oasis, *Zoonoses Public Health* 66 (5) (2019) 495–503.
- [30] I.V. Llopis, L. Rossi, A. Di Gennaro, A. Mosca, L. Teodori, L. Tomassone, E. Grego, F. Monaco, A. Lorusso, G. Savini, Further circulation of West Nile and Usutu viruses in wild birds in Italy, *Infect. Genet. Evol.* 32 (2015) 292–297.
- [31] V. Chevalier, P. Reynaud, T. Lefrançois, B. Durand, F. Baillon, G. Balança, N. Gaidet, B. Mondet, R. Lancelot, Predicting West Nile virus seroprevalence in wild birds in Senegal, *Vector-Borne Zoonotic Dis* 9 (2009) 589–596.
- [32] J. Amdouni, F. Monaco, O. Portanti, S. Sghaier, A. Conte, T. Ben Hassine, A. Polci, F. Valleriani, A. Di Gennaro, M. Zoueri, Detection of enzootic circulation of a new strain of West Nile virus lineage 1 in sentinel chickens in the north of Tunisia, *Acta Trop.* 202 (2019) 105223.
- [33] R. Bargaoui, S. Lecollinet, R. Lancelot, Mapping the serological prevalence rate of West Nile fever in Equids, Tunisia, *Transbound. Emerg. Dis.* 62 (2015) 55–66.
- [34] A. Benjelloun, M. El Harrak, B. Belkadi, West Nile disease epidemiology in North-West Africa: bibliographical review, *Transbound. Emerg. Dis.* 63 (6) (2016) e153–159.
- [35] I. Lafri, C.M. Prat, I. Bitam, P. Gravier, M. Besbaci, F. Zeroual, M.H. Ben-Mahdi, B. Davoust, I. Leparac-Goffart, Seroprevalence of West Nile virus antibodies in equids in the North-East of Algeria and detection of virus circulation in 2014, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 50 (2017) 8–12.
- [36] F.J. May, C.T. Davis, R.B. Tesh, A.D.T. Barrett, Phylogeography of West Nile virus : from the cradle of evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas, *J. Virol.* 85 (2011) 2964–2974.