الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire

Domaine : Sciences de la nature et de la vie Filière : Sciences vétérinaires

Mémoire de fin d'études

Pour l'obtention du diplôme de Master en Médecine vétérinaire

THEME

Contribution à une étude de la prévalence du virus de la West Nile chez les chevaux dans la wilaya d'Alger

Présenté par :
Melle **KHEMRI Ines**

Soutenu, le 28/10/2020 devant le jury :

Mr ZAOUANI M.	MCA (ENSV)	Président
Mme ZENAD W.	MAA (ENSV)	Examinatrice
Mr. MIROUD K.	MCA (ISV El Taref)	Promoteur
Mme AIT OUDHIA K.	PROFESSEUR (ENSV)	Co-promotrice

2019-2020

REMERCIEMENTS

A notre promotrice Pr : AIT OUDHIA Khatima. Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'avoir accepté de nous encadrer, nous la remercions profondément d'avoir été présente à tout moment pour la réalisation de ce travail, pour ses encouragements continuels et motivants, pour son soutien moral et ses remarques pertinentes. Nous voudrons également lui témoigner notre sincère gratitude pour sa patience et son énorme gentillesse qui nous ont été précieuses afin de mener ce travail à bon port.

Au Dr M.ZAOUANI : Enseignant à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire pour nous avoir fait l'honneur d'accepter de présider notre jury. Veuillez trouver ici l'assurance de nos sincères remerciements et de notre profond respect.

Au Dr. W.ZENAD : Enseignante à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire, d'avoir accepté d'examiner ce travail après tout ce que vous nous avez appris durant notre cursus, merci d'avoir partagé avec nous votre amour pour cette noble profession.

A madame ZIANI Imene. Nous vous présentons nos vifs remerciements pour tout ce que vous avez fait pour réaliser ce travail. Vous l'avez dirigé avec une disponibilité constante, vos compétences, votre rigueur ainsique vos conseils mémorables nous ont beaucoupappris.

Au Professeur KHEMRI D, du service de néphrologie de l'hôpital Mustapha que nous remercions de nous avoir soutenu dans la réalisation de ce projet.

Nous tenons à remercier tous ceux qui ont participé de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

Déclaration sur l'honneur

Je sous soussigné(e), KHEMRI Ines, déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sous toute forme de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer toutes sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature

KHEMRI Ines.

INTRODUCTION IX
I. I . Généralités sur le virus du Nil occidental. 1
1. Qu'est-ce que le virus du Nil occidental ? 1
1.1. Définition 1
1.2. Historique et répartition géographique : 1
2. Quel est l'agent pathogène responsable de la maladie ? 3
2.1. Taxonomie et phylogénie 3
2.1.1. Classification virale 3
2.1.2. Lignages du WNV 3
2.2. Caractéristiques structurale et morphologique. 6
2.2.1. La particule virale 6
2.2.2. Organisation génomique 7
2.2.3. Capacité de survie dans l'environnement. 9
2.2.4. Cycle de réplication viral. 9
2.2.5. Cycle de transmission du virus. 12
3. Diagnostic de la maladie. 14
3.1. Diagnostic clinique et épidémiologique. 14
3.2. Diagnostic de certitude. 15
4. Prévention et mesure de lutte. 16
4.1. Traitement. 16
4.2. Vaccination 17
II. Déroulement général de l'étude. 18
1. Objectif de l'étude. 18
2. Présentation de la problématique de recherche. 18
A. Le virus de la WN circule-t-il dans la population équine de la wilaya d'Alger ? 18
B. Quels sont les facteurs de risques du virus de la West Nile ? 18
3. Schéma de l'étude et les caractéristiques des sujets de l'échantillon 19
A. Schéma général de l'étude : 19
B. Définition de la population étudiée : 19
III. Matériels et méthode 19
1. Réalisation du questionnaire 19
2. Délimitation des zones. 21
3. Prélèvement de sang. 23

3.1. Etapes de prélèvement sanguin 23
3.2. Acheminement des prélèvements vers le laboratoire. 25
4. Test ELISA. 27
4.1. Description du test. 27
4.2. Composition du kit ELISA 28
4.3. Matériels de laboratoire 28
4.4. Mode opératoire 29
IV. Résultats obtenus dans le cadre de l'étude du Virus West Nile et discussion : 31
1. **Séroprévalence globale** 31
2. Prévalence de la WNF selon la région étudiée : 32
3. Etude des facteurs de risque individuels : 33
3.1. Selon le sexe de l'animal : 33
3.2. Selon l'âge de l'animal : 34
V. Conclusion et recommandations. 35
1. Surveillance passive 36
2. Surveillance active 37
Références : 38

Liste des figures :

Figure 1 : Distributions géographiques connues du WNV obtenues entre 1937 et 2016 (ASSANE Gueye., 2019). 2
Figure 2 : Les principaux Flavivirus pathogènes et leurs sérogroupes d'appartenance (FURNON, 2018). 5
Figure 3 : Arbre phylogénétique du WNV représentant les 9 lignages(KEMENESI G., 2014) 6
Figure 4 : Organisation virale et composition du virion du WNV(CHANCEY C., 2015). 8
Figure 5: Représentation schématique d'une coupe transversale de la particule virale WNV 8
Figure 6 : Organisation génomique du WNV(Furnon W. , 2018). 9
Figure 7 : Mécanisme de fusion pH-dépendante de la membrane virale avec la membrane de l'endosome médié par la protéine E d'enveloppe(Furnon W. , 2018). 10
Figure 8 : Représentation schématique récapitulative du cycle de multiplication virale du WNV(FURNON, 2018). 11
Figure 9 : Représentation schématique du cycle de transmission du WNV.(Furnon W. , 2018) 13
Figure 10: Représentation schématique des méthodes ELISA les plus utilisées pour le diagnostic du WNV (BECK C., 2013) 16
Figure 11: L'habitat des chevaux prélevés. 20
Figure 12 : Les conditions hygiéniques de l'habitat des chevaux. 21
Figure 13: Région Est et le lac Reghaia a proximité 22
Figure 14: Zone ouest avec le lac du parc Dounia a proximité 23
Figure 15:Matériels utilisé pour prélèvement sanguin 23
Figure 16: Prélèvements sanguin à partir de la veine jugulaire. 25
Figure 17:Protection des tubes remplis de sang dans une boite, dans une glacière. 25
Figure 18: Centrifugation des tubes remplis de sang dans la centrifugeuse. 26
Figure 19:Tube sanguin après centrifugation séparation du sang en deux phases : a : plasma, b : le culot. 26
Figure 20:Prélèvement du sérum après centrifugation 27
Figure 21 : Kit ELISA ID SCREEN®, amener les réactifs, les microplaques et les sérums a température ambiante, et numéroter les microplaques. 30
Figure 22: Lavage avec la solution de lavage 1X figure : distribution du conjugué 1X 30
Figure 23 : Plaque après incubation avec la Solution de Révélation coloration du substrat Passage de l'incolore au bleu 30
Figure 24: Lecture et Calcul des densités au spectrophotomètre. ELISA 31

Liste des abréviations.

A.M.M.	Autorisation de Mise sur le Marché
Ac	Anticorps
ADE	Antibody-dependant enhancement
ADN	Acide Désoxyribonucléique
Ae	Aedes
AA	Anautogène
ARN	Acide ribo-nucléique
ARNm	Acide ribonucléique messanger
Cm	Centimétre
CPC	Virus Cacipacore
Cx	Culex
DO	Densité Optique
DO-CN	Densité Optique du Contrôle Négatif
DO-CP	Densité Optique du Contrôle Positif
EHV-1	Herpès virus équin de type 1 la rhinopneumonie
EJ	Encéphalite Japonaise
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Test Immuno-Enzymatique)
Fc	Fragment Constant
FNO	Fièvre du Nil de l'ouest ou occidental
I.M	Intra musculaire
IC	Intervalle de confiance
Ig	Immunoglobulines
IgG	Immunoglobulines de classe G
IgM	Immunoglobulines de classe M
IV	Intraveineuse

LCR Liquide céphalo-rachidien

LT Lymphocyte T

MDO Maladie à Déclaration Obligatoire

MEMV Méningo-encéphalo-myélite virale

MRLC Maladie Réputée Légalement Contagieuse

nRT-PCR Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction nichée

NS1 Protéine non structurale 1 du virus West Nile

NS3 Protéine non structurale 3 du virus West Nile

NS5 Protéine non structurale 5 du virus West Nile

OIE Organisation mondiale de la santé animale

PCR Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaîne)

PIE Période d'incubation extrinsèque

Protéine C Protéine de la capside

Protéine E Protéine d'enveloppe virale

RE Réticulum endoplasmique

SNC Système nerveux central

SNP Système nerveux périphérique

TMB Solution de révélation

VNO Virus du Nil Occidental

VWN Virus West Nile

WN West Nile

WNF West Nile Fever

Résumé.

Objectif: La fièvre West Nile, est une maladie virale qui se transmet à l'homme et au cheval par piqure de moustiques, dont les hôtes réservoirs sont les oiseaux sauvages.

L'incidence de l'atteinte neurologique humaine et équine a considérablement augmenté, cette étude a pour but de démontrer que la présence des zones humides, la prolifération des vecteurs, la présence des couloirs migrateur aviaires, la densité des oiseaux et l'occurrence d'une épidémie l'année précédente sont des facteurs contribuant à l'augmentation de l'incidence et de la propagation du virus.

Ces facteurs doivent être pris en considération afin d'améliorer les performances des modèles prédictifs et la mise en place d'un système de surveillance et des mesures de prévention appropriées.

Matériel et méthode : dans cette étude pour une étude sérologique de la fièvre West Nile, des échantillons de sang de 151 chevaux dans la région d'Alger et ses environs à forte population équine sont collectés et analysés à l'aide d'un test Elisa.

Résultat: sur la base de nos résultats une séroprévalence de 42.3% des échantillons au total étaient positifs pour les anticorps anti-WNF contre 58% négatifs.il y'avait une différence significative entre le sexe et l'âge, en effet les femelles semblent être plus touchées par le virus du fait de l'immunodépression lors de gestation et de lactation. Nous avons constaté que les jeunes chevaux de moins de 11 ans semblent plus sujets à l'infection, en vue de leurs activités de loisirs et sportifs, donc plus susceptibles d'être contaminés par exposition aux piqures de moustiques que les adultes.

Conclusion: cette étude a démonté la présence d'anticorps anti-WNF sur des populations de chevaux en Algérie plus précisément dans les régions marécageuse et humides. La présence des moustiques vecteurs dans ces zones tempérées et humides par la présence des lacs de Reghaia à l'Est d'Alger et du lac de parc Dounia a l'Ouest d'Alger, contribuent fortement à la prolifération des vecteurs et la propagation du virus dans le pays.

Motsclés: Virus West Nile, la Fièvre West Nile, propagation, vecteurs, réservoirs, oiseaux migrateurs, chevaux.

ملخص

الغرض: حمى غرب النيل مرض فيروسي ينتقل إلى الإنسان والخيول عن طريق لدغات البعوض ، التي تستضيفها طيور برية.

لقد زاد معدل حدوث الأضرار العصبية للإنسان والخيول بشكل كبير ، وتهدف هذه الدراسة إلى إثبات وجود الأراضي الرطبة ، وتكاثر النواقل ، ووجود ممرات هجرة الطيور ، وكثافة الطيور وحدوث إن حدوث وباء في العام السابق من العوامل التي تسهم في زيادة الإصابة بالفيروس وانتشاره.

يجب أن تؤخذ هذه العوامل في الاعتبار من أجل تحسين أداء النماذج التنبؤية وإنشاء نظام مراقبة وتدابير وقائية مناسبة.

المادة والطريقة: في هذه الدراسة من أجل دراسة مصلية لحمى غرب النيل ، تم جمع عينات دم من 151 حصانًا في منطقة الجزائر العاصمة والمناطق المحيطة بها مع عدد كبير من الخيول وتحليلها باستخدام اختبار إليسا. .

النتيجة: بناءً على النتائج التي توصلنا إليها ، كان الانتشار المصلي بنسبة 42.3٪ من العينات في المجموع موجبًا للأجسام المضادة لـ WNF بالفيروس بسبب التثبيط المناعي أثناء الحمل والرضاعة. لقد وجدنا أن الخيول الصغيرة التي تقل أعمارها عن 11 عامًا تبدو أكثر عرضة للإصابة ، بسبب أنشطتها الترفيهية والرياضية ، وبالتالي فهي أكثر عرضة للإصابة بالعدوى عن طريق التعرض للدغات البعوض.

الخلاصة: أظهرت هذه الدراسة وجود الأجسام المضادة لـ WNF في تجمعات الخيول في الجزائر ، وبشكل أكثر دقة في مناطق المستنقعات والرطبة. يساهم وجود البعوض الناقل في هذه المناطق المعتدلة والرطبة بوجود بحيرات الرغاية شرق الجزائر العاصمة وبحيرة دنيا غرب الجزائر العاصمة بقوة في تكاثر النواقل وانتشار الجراثيم. فيروس في البلاد.

الكلمات المفتاحية: فيروس غرب النيل ، حمى غرب النيل ، الانتشار ، النواقل ، الخزانات ، الطيور المهاجرة ، الخيول

Abstract :

Purpose: West Nile fever, is a viral disease transmitted to humans and horses through mosquito bites, the reservoir hosts of which are wild birds.

The incidence of human and equine neurological damage has increased considerably, this study aims to demonstrate that the presence of wetlands, the proliferation of vectors, the presence of avian migratory corridors, the density of birds and the occurrence of 'an epidemic in the previous year are factors contributing to the increased incidence and spread of the virus.

These factors must be taken into account in order to improve the performance of predictive models and the establishment of a monitoring system and appropriate prevention measures.

Material and method: in this study for a serological study of West Nile fever, blood samples from 151 horses in the region of Algiers and its surroundings with a large equine population are collected and analyzed using an Elisa test .

Result: based on our results a seroprevalence of 42.3% of the samples in total were positive for anti-WNF antibodies against 58% negative. There was a significant difference between sex and age, indeed females appear be more affected by the virus due to immunosuppression during pregnancy and lactation. We have found that young horses under the age of 11 appear to be more prone to infection, for their leisure and sport activities, and therefore more likely to be infected by exposure to mosquito bites than adults.

Conclusion: this study demonstrated the presence of anti-WNF antibodies in populations of horses in Algeria, more precisely in marshy and humid regions. The presence of vector mosquitoes in these temperate and humid zones by the presence of the Reghaia lakes to the east of Algiers and of the Dounia lake to the west of Algiers, strongly contribute to the proliferation of vectors and the spread of the virus in the country.

Keywords: West Nile virus, West Nile Fever, spread, vectors, reservoirs, migratory birds, horses.

INTRODUCTION

Une maladie ancienne, aujourd'hui faisant la une, la fièvre du Nil de l'ouest ou occidental (FNO) connue aussi sous l'acronyme anglais de la West Nile Fever (WNF), est une zoonose vectorielle ré-émergente. Celle-ci occupe le devant de la scène scientifique et médiatique Elle est due à un arbovirus du genre *Flavivirus* appartenant à la famille des *Flaviviridae*.

La virus de la West Nile a été décrit pour la première fois en 1933 (Zeller *et al.,* 2001), isolé par la suite en 1937 à Omogo dans le district du Nil de l'Ouest au nord de l'Ouganda, à l'ouest du Nil Albert (Anderson *et al.* 1999).Les premières éclosions ont été rapportées dans les années cinquante en Israël (Hubalek&Halouzka, 1999). Durant cette même période, le cycle de transmission a été décrit où des arthropodes hématophages du genre *Culex* en étaient responsables. Ces derniers s'infectent en piquant des oiseaux réservoirs et/ou amplificateurs et infectent à leur tour d'autres oiseaux, chevaux, hommes et d'autres mammifères conduisant à des manifestations allant d'une fièvre bénigne jusqu'à une méningo-encéphalite parfois mortelle. L'homme, comme le cheval constituent des hôtes accidentels - des impasses au cycle.

Cette maladie est en train de se propager depuis quelques années dans les parties du monde avec des répercussions croissantes sur les santés animale et humaine. Elle a occasionné différentes épizooties de méningo-encéphalites chez l'homme ainsi que chez le cheval avec des conséquences graves dans le bassin méditerranéen, en Europe, en Asie et en Amérique du nord (Rossi *et al.* 2010; Zeller &Schuffenecker, 2004), où des pertes humaines et animales ont déjà été rapportées et peut être à l'origine de véritables pertes sanitaire et économique.Il faut dire que cette arbovirose réapparait selon un cycle de 3 à 5 ans, où son incidence demeure faible et la circulation virale chez les hôtes reste ardue.

L'importance d'étudier les zoonoses vectorielles émergentes , n'est plus à démontrer d'un point de vue sanitaire, aussi bien pour l'homme que pour l'animal, donnant tout son sens à un nouveau concept à titre d'exemple celui qui a été établi à New York en 2004 "One World, One Health" qui est une marque de la Wildlife Conservation Society.Ce dernier met en avant une approche interdisciplinaire et transversale de la prévention des maladies épizootiques et prévoit de maintenir l'intégrité des écosystèmes en réduisant les risques de ces maladies.

La maladie est entrain de regagner en activité dans le bassin méditerranéen, en Afrique du nord mais aussi dans d'autres parties du globe où elle suscite un grand intérêt et d'avantage de questions : Qu'en est –il du statut sanitaire actuel de l'infection en Algérie ?

La prévalence de la WNF équine est relativement méconnue. Jusque-là, très peu d'études ont été faites en Afrique et aucune étude n'a été faite sur population équine en Algérie. Ce travail a été entrepris dans le but de :

- Etudier le taux d'infection des équidés par le virus West Nile,
- Préciser la situation actuelle de la maladie dans la wilaya d'Alger.
- Avoir un aperçu sur la situation relative à cette arbovirose en Algérie par une recherche d'une éventuelle circulation à bas bruit du virus dans les régions étudiées afin de ''localiser'' des foyers à risque en pointant du doigt les paramètres prédisposants et favorisants.

Suite à une étude bibliographique basée sur une revue exhaustive de la littérature sur ce sujet à partir d'articles scientifiques ,visant à soulever le voile sur la maladie de West Nile en Algérie et éventuellement sur la probabilité de la réémergence après une longue période de silence clinique, une étude expérimentale est présentée en exploitant des prélèvements de sérums équins provenant de chevaux des régions rurales et citadines d'Alger qui résulte de la collaboration de nombreux propriétaires de chevaux, de vétérinaires et aussi de clubs hippiques.

I . Généralités sur le virus du Nil occidental.

1. Qu'est-ce que le virus du Nil occidental ?

1.1. Définition.

Le virus du Nil occidental (VNO), en anglais *West-Nile Virus*, est un arbovirus isolé pour la première fois chez l'Homme en Ouganda en 1937. Ce virus appartient au genre Flavivirus de la famille des Flaviviridae qui comprend des virus dont le virus de la fièvre jaune, le virus de la dengue et le virus Zika(Hayes E.B., 2006).Le VNOse transmet d'un hôte a un autre par les moustiques et se maintient dans la nature par un cycle enzootique qui implique une transmission entre les oiseaux qui sont un réservoir du virus et les moustiques. Cependant, l'homme et le cheval sont considérés comme une impasse pour ce cycle étant donné que ces deux espèces sont des hôtes terminaux accidentels(DL, 2008). La majorité des infections humaines et équines sont bénignes et asymptomatiques (DANIS K., 2011).Or, il existe une forme symptomatique légère de la maladie ou les sujets présentent des symptômes pseudo-grippaux(HUBÁLEK, 2001),ainsi qu'une forme neuro-invasive grave pouvant être mortelle, touchant principalement les sujets âgés et se manifeste par une méningo-encéphalite ou une paralysie aiguë(GRAY T.J., 2014).

1.2. Historique et répartition géographique :

WNV a été décrit pour la première fois en 1937 en Ouganda dans la province « WestNile » et cela à partir d'un échantillon sanguin d'une femme qui présentait une forte poussée de fièvre(SMITHBURN K., 1940).Le virus appartenant à la lignée 1 a ensuite circulé en Afrique et dans tout le bassin méditerranéen en touchants quelques cas isolés dans la population équine. Puis, il a été identifié pour la première fois en Europe en 1960après la réalisation d'isolement viraux en France et au Portugal(FILIPE A.R., 1969). Après plus de 30 années de silence, WNV a connu une nouvelle vague épidémiologique en Afrique du nord : en Algérie en 1994,au Maroc en 1996, et en Tunisie en 1997. Ensuite, il a été signalé en Roumanie en 1996 (C.S, 1997-2000)et en Russie en 1999 avant de réémerger en Italie en 1998 (G.L, 2002) et en France en 2000 (B, 2001).

Des souches hautment pathogènes touchant les oiseaux et certains mammifères ont été isolées au Moyen-Orient en 1998. Puis, en 1999 a New York une souche,très proche de celle isolée en 1998, a été identifiée avant de se diffuser dans tout le continant americaintouchant ainsi plus de 39300 cas humains dont 1600 morts et 25000 cas dans l'espèce equine (Prevention, n.d.). De 1999 à 2017, le continent Americain notifie 48183 cas confirmés et probables du WNV, avec 22299 cas de maladie neuroinvasive(CURREN EJ., 2017).Néanmoins, la situation en Europe

reste différente que celle décrite aux Etats-Unis, WNV a été associé à quelques cas sporadiques dans le bassin méditerranéen et en Europe de l'est en connaissant des flambées entre mi-juillet et octobre et cela à cause de l'abondance du vecteur pendant cette période. Or, le continent a connu une nouvelle activité de WNV après introduction de deux nouvelles souches virales dont l'une originaire d'Afrique a été signalée en 2004en Hongrie puis a diffusé en Autriche et dans les pays de l'Europe du sud(PAPA A., 2012). Et l'autre ayant été détectée au sud de la Russie dans la région de Rostov Oblast en 2004 pour diffuser ensuite au sud-ouest de la Russie et en Roumanie en 2010 (PLATONOV A.E., 2011).

Le continent Européen a été marqué par d'importantes épidémies lors des saisons 2010-2013 avec le taux le plus élevé de cas en 2010ou 334 cas humains ont été associés à des infections neuro-invasives dont 262 cas en Grèce et 34 morts en Macédoine(PAPA A. D. K., 2010).

Plus récemment, en décembre 2019, les pays membres de l'union européenne et leurs pays voisins avaient recensé plus de 463 infections humaines en notifiant 223 en Grèce. Ainsi que 93 foyers chez les équidés et 54 foyers chez les oiseaux dont 53 en Allemagne (ECDC, 2019).

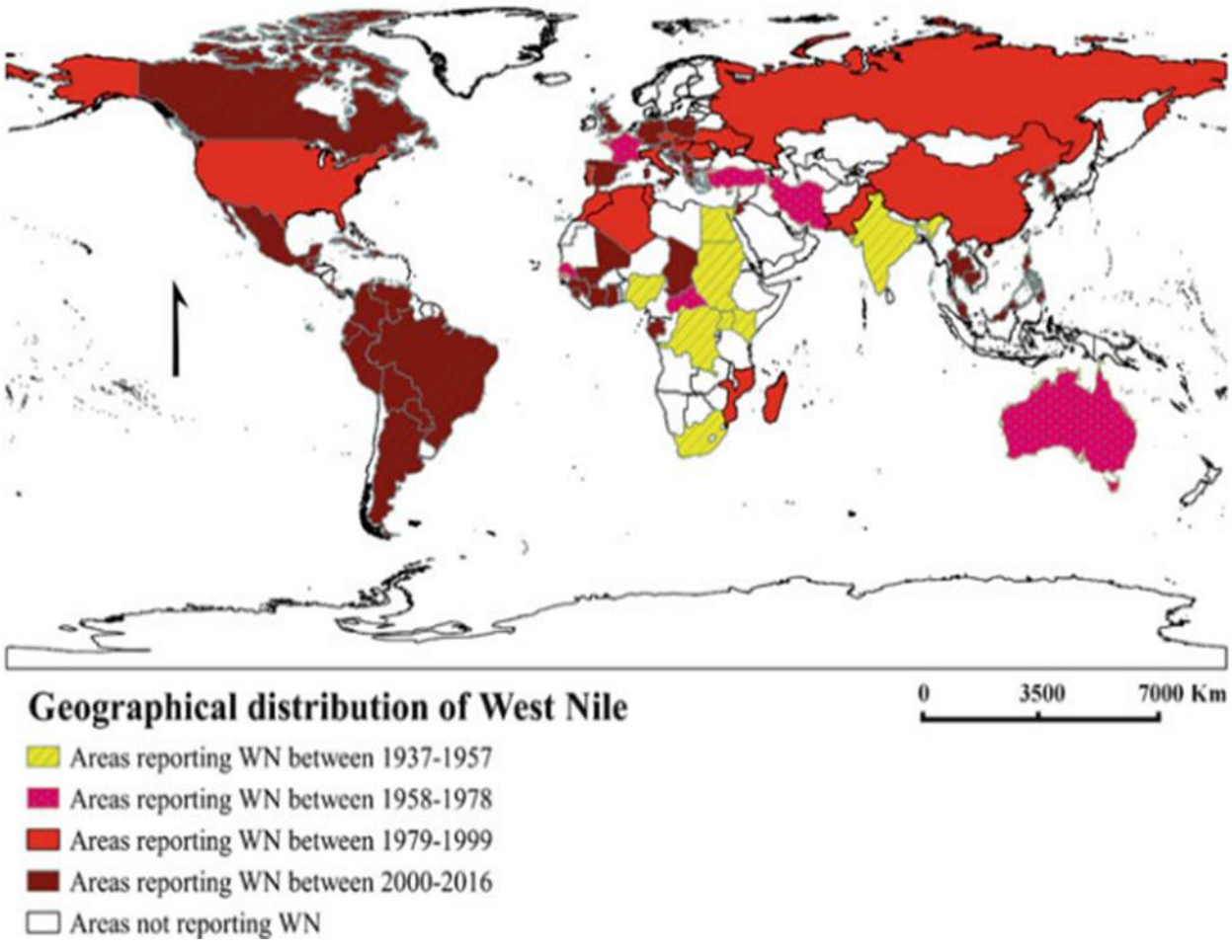


Figure 1 : *Distributions géographiques connues du WNV obtenues entre 1937 et 2016 (ASSANE Gueye., 2019).*

2. Quel est l'agent pathogène responsable de la maladie ?

2.1. Taxonomie et phylogénie

2.1.1.Classification virale

Le virus du Nil occidental est un arbovirus transmis par des moustiques et appartenant au genre Flavivirusde la famille des Flaviviridae quicomprendle plus grand nombre d'espèces virales par rapport aux autres genres.Les Flaviviridae comprennentà titre d'exemple levirus de l'hépatite (Hepacivirus) et le virus de la peste porcine classique (Pestivirus) (SCHWEITZER B.K., 2009). Ainsi quede nombreuses espèces virales pouvant non seulement infecter les arthropodes mais aussi les vertébrés. Cependant, certains de ces virus peuvent se multiplier uniquement chez les insectes et sont donc incapable de se répliquer dans les cellules d'une espèce vertébrée(MCLEAN B.J., 2015).

Il existe plus de 70 Flavivirus transmis par des arthropodes et infectant un large spectre d'hôtes vertébrés dont l'homme et de ce fait, représentent un réel danger pour la santé publique. Parmi ces espèces, on peut citer l'exemple du WNV ainsi que le virus de l'encéphalite japonaise, le virus de l'encéphalite à tique, le virus de l'encéphalite de Saint Louis, le virus de l'encéphalite de la vallée de Murray, mais aussi le virus Zika. D'autres espèces virales causant de la fièvre hémorragique et faisant partie des Flavivirus peuvent être citées. Les plus communes d'entre elles sont le virus de la dengue, le virus de la fièvre jaune, le virus de la maladie de la forêt de Kyasanur ou encore le virus de la fièvre hémorragique d'Omsk.

WNV ainsi que d'autres espèces de Flavivirus dont le virus de l'encéphalite japonaise, le virus de l'encéphalite de Saint Louis et le virus de l'encéphalite de la vallée de Murray,sont transmis par des moustiques et sont responsables d'encéphalites(Furnon, 2018).

2.1.2. Lignages du WNV

WNV est un virus diversifié génétiquement et géographiquement. En effet,grâceà des analyses phylogéniqueseffectuées sur le génome entierou bien sur la polymérase NS5, ontdémontré que le virus du Nile occidentalpeut présenter jusqu'à 9 gènes différents les uns des autres de plus de 20-25%séquences nucléotidiques(CHANCEY C., 2015).Ces résultats ont permis l'isolement géographique des différents isolats de WNV ainsi que la numérotation des différentes lignées en sept lignées dont deux sont majeures et associées à des épidémies humaines importantes (figure 2).

Le premier lignage est connu pour la répartition géographique très vaste de ses souches virales du fait que des isolats ont été retrouvés dans les cinq continents (CHANCEY C., 2015) (RIZZOLI A., 2015).
Cette lignée est subdivisée en 3 clades (clade 1a, 1b et 1c).Le premier clade WNV-1a étant les plus important étant donné de sa circulation en Afrique, en Amérique, en Europe et au Moyen-Orient, est lui-même repartis en 6 clusters et cela en fonction de la région ou il se trouve(CHARREL R.N., 2003).
Le clade WNV-2b présente les souches du virus australien Kunjin(VAZQUEZ A., 2010).
Pour sa part, WNV-1c correspond aux isolats presents en Inde et cela après avoir été considéré comme le lignage 5qui est un lignage génétique spécifique (BONDRE V.P., 2007).

Le second lignage comprend essentiellement les souches détectées chez l'homme et le cheval et isolées en Afrique subsaharienne et à Madagascar (VENTER M., 2010). Cependant, ce dernier a été répondu en Europe au cours des dernières décennies après augmentation de la morbidité chez les mammifères (CIRCOZZI M., 2013). Après analyse du gène E et NS5, il a été suggéré que l'introduction de la lignée a eu lieu en deux fois depuis l'Afrique et cela en 1999 en Europe centrale et en 2000 en Russie. Quatre ans après, en Hongrie, des oiseaux de proie ont présenté des souches virales du lignage 2(BAKONYI T., 2006). En 2010, La Roumanie et la Grèce ont été touchés par des flambées de grande ampleur(VALIAKOS G., 2011). Une année après, le virus a été identifié pour la première fois en Italie (CICCOZZI M., 2013).

Le troisième lignage quant a lui englobe des souches non pathogènes pour les mammifères dont la souche Rabensburgisolées en République tchèque. Ces souches circulent principalement chez certaines espèces de moustiques dont les moustiques Culex et Aedes Moravie méridionale(BAKONYI, 2006).

Le quatrième lignage est subdivisé en trois clades, 4a, 4b et 4c. Le clade 4a a été détecté chez une tique spécimen du Caucase (MAY F.J., 2011). Le clade 4b anciennement considéré comme la lignée 6 et 7 a été isolé en 2006 en Espagne chez des moustiques culex pipiens (VAZQUEZ A., 2010). Le clade 4c quant a lui a été classé précédemment comme lignée 9 et a été isolé en 2013 en Autriche chez des moustiques Uranotaenia un guiculata. (RIZZOLI A., 2015).

Les lignages 6 et 7 concernent respectivement des virus isolés en Malaisie pour le virus Sarawak et au Sénégal pour le virus Koutango (CHANCEY C., 2015) (RIZZOLI A., 2015).

Des études récentes ont proposé l'ajout de deux autres lignées pour des souches isolées en Espagne et en Autriche (KEMENESI G., 2014).

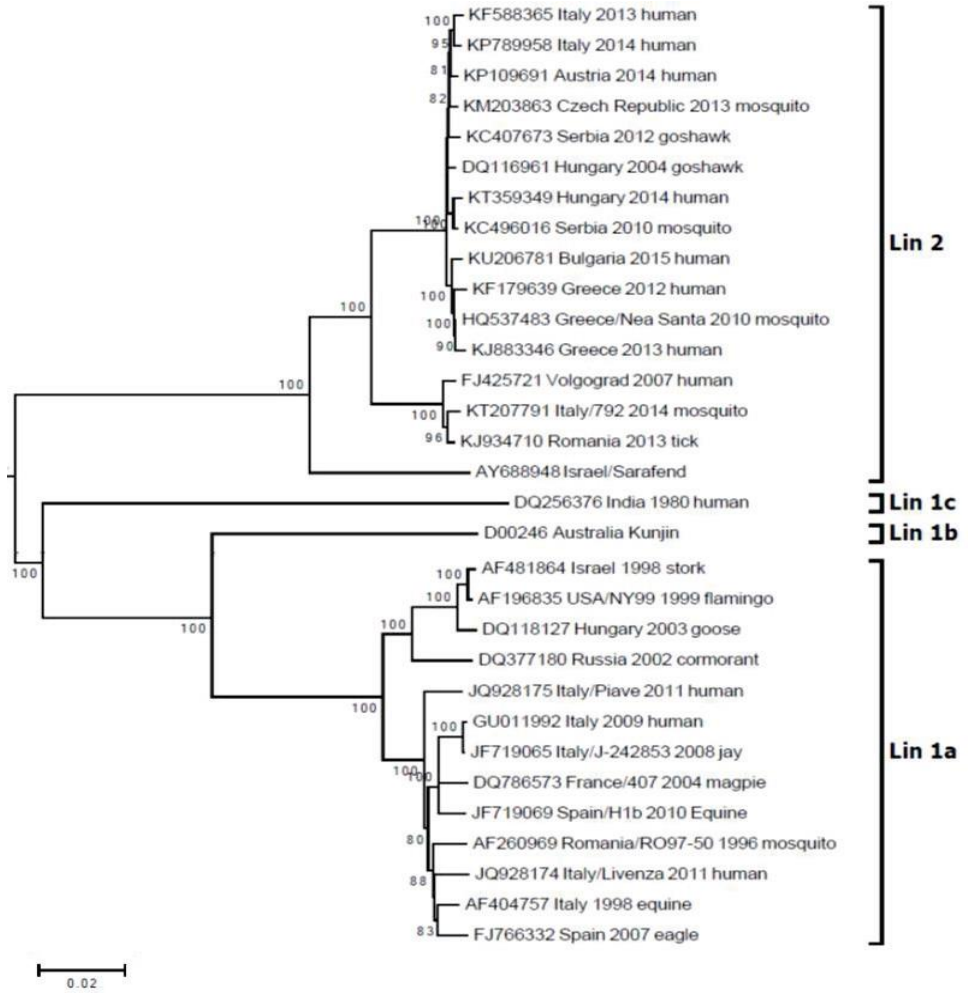


Figure 2 : *Les principaux Flavivirus pathogènes et leurs sérogroupes d'appartenance (FURNON, 2018).*

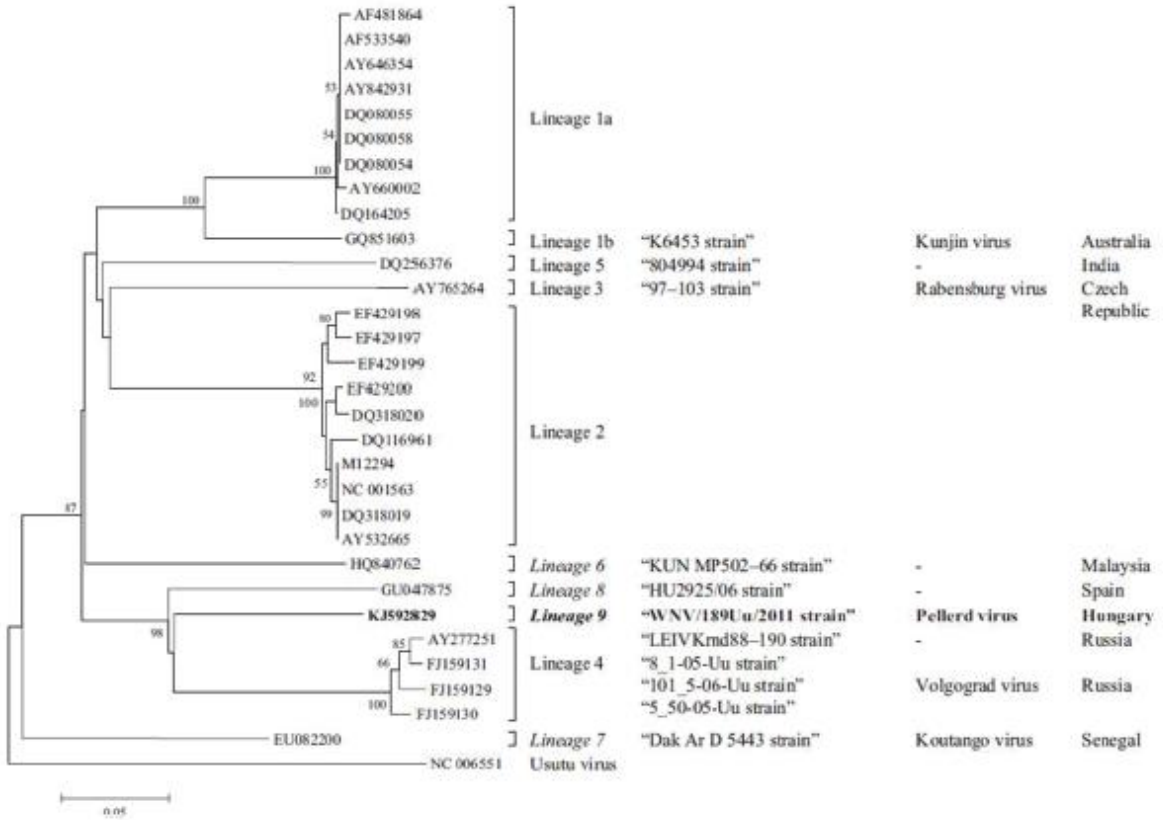


Figure 3 : *Arbre phylogénétique du WNV représentant les 9 lignages(KEMENESI G., 2014)*

2.2. Caractéristiques structurale et morphologique.

2.2.1. La particule virale

Le WNV comme tous les virus du genre Flavivirus, est un virus enveloppé d'une bicouche lipidique (Figure 4) d'une taille de 50nm de diamètre et présentant une nucléocapside a symétrie icosaédrique (KNIPE D.M., 2013).La surface du virion est constituée de deux protéines structurales principales. La première étant la protéine d'enveloppe E est une hémagglutinine virale et ciblée principalement par la réponse immunitaire de l'hôte. La deuxième quant à elle est la protéine de membrane M qui agit comme un facteur de stabilisation protégeant la protéine E lorsqu'elle est transportée de la cellule infectée pendant la réplication(SCHWEITZER B.K., 2009).Le core du virus, contenant le génome viral en le protégeant, est constitué à son tour d'une seule protéine structurale qui est la protéine de capside C permettant de former la nucléocapside **(Figure 5)**(Furnon W. , 2018).

2.2.2. Organisation génomique

Le génome du WNV présente comme chez tous les Flavivirus un ARN simple brin de polarité positive d'une taille de 11kb environ. La molécule porte à son extrémité 5' une coiffe (7mGpppN) et ne présente pas une polyadénylation en 3'**(Figure 6A).**Le génome présente des régions non codantes (UTR) aux extrémités 3' et 5' formant des structures secondaires qui sont nécessaires aux étapes de transcription, de traduction et d'empaquetage de l'ARN du virus **(Figure 6A)** (BRINTON M.A., 1988)**.**La région codante présente une seule ouverture cadre de lecture (ORF) d'une taille de 3300 acides aminés (aa)**(Figure 6A).** L'ensemble du génome est codé en une polyprotéine qui sera ensuite clivée et transformée co- et post-traductionnelle par des protéases cellulaires et virales en 3 protéines structurales (C, prM/M et E) codées à l'extrémité 5 ', et 7 protéines non structurelles (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5) non codées dans l'extrémité 3'**(Figure 6 B-C)**(KNIPE D.M., 2013).

- Les protéines structurales :

La protéine de capside(C) du WNV compose la nucléocapside et s'associe au génome de l'ARN en assurant l'encapsidation du génome viral. La glycoprotéine précurseur (prM)est quant à elle clivée pendant la maturation virale pour donner la protéine transmembranaire (M) ainsi que la protéine d'enveloppe (E) qui sont tous deux nécessaires aux interactions et à la fusion avec la cellule cible(KIMURA T., 1988). La protéine E est considérée comme la principale cible de neutralisation par les anticorps(KNIPE D.M., 2013).

- Les protéines non-structurales :

Les sept protéines non structurales sont impliquées dans la synthèse de l'ARN viral ainsi que dans l'assemblage des particules virales et l'évasion du virus a la défense antivirale de l'hôte(M.A, 2013). NS1 intervient d'une manière précoce dans la régulation de la réplication de l'ARN viral (KNIPE D.M., 2013). Les protéines NS2A, NS2B, NS4A et NS4Bsont des petites protéines hydrophobes n'ayant pas concernés les caractéristiques connues des enzymes. NS3 présente quant à elle de nombreuses fonctions enzymatiques, et permet de cliver les autres protéines non structurales du virus de par son rôle de serine protéase et cela après association avec NS2B et une ARN hélicase en association avec NS4A (KNIPE D.M., 2013). NS5 est connue pour être une protéine multifonctionnelle d'un poids moléculaire le plus important et le mieux conservé de tous les Flavivirus(ZHOU Y., 2007). Cette protéine est nécessaire pour la réplication de l'ARN viral et cela en faisant intervenir des protéines virale et cellulaires (CHU

P.W.G., 1987). Elle contient également 32Activité méthyltransférase dans la région N-terminale et ARN polymérase/ARN dépendante dans la région C-terminale.

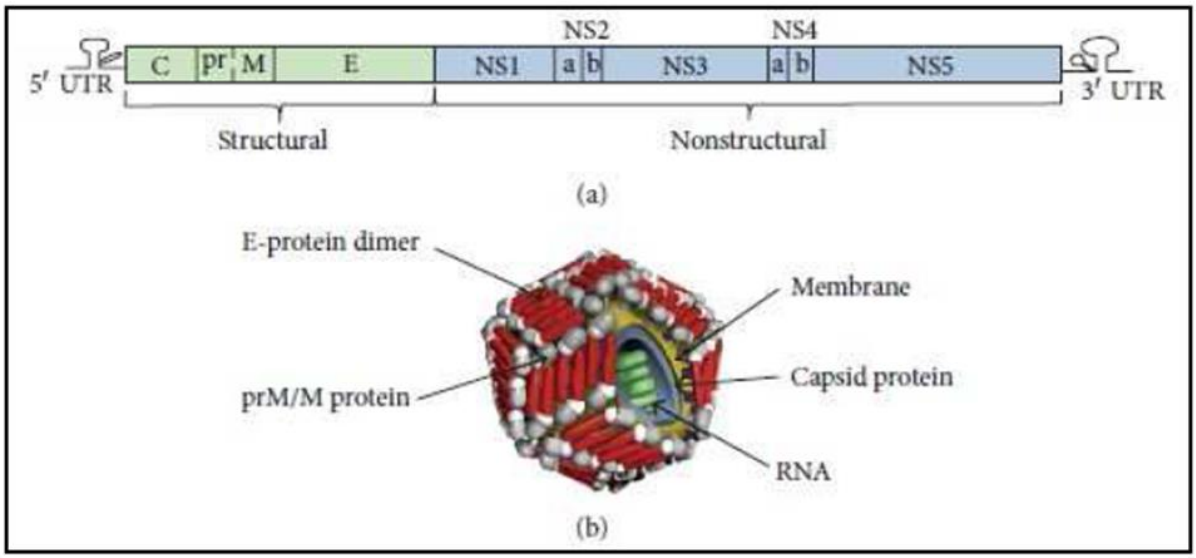


Figure 4 : *Organisation virale et composition du virion du WNV(CHANCEY C., 2015).*

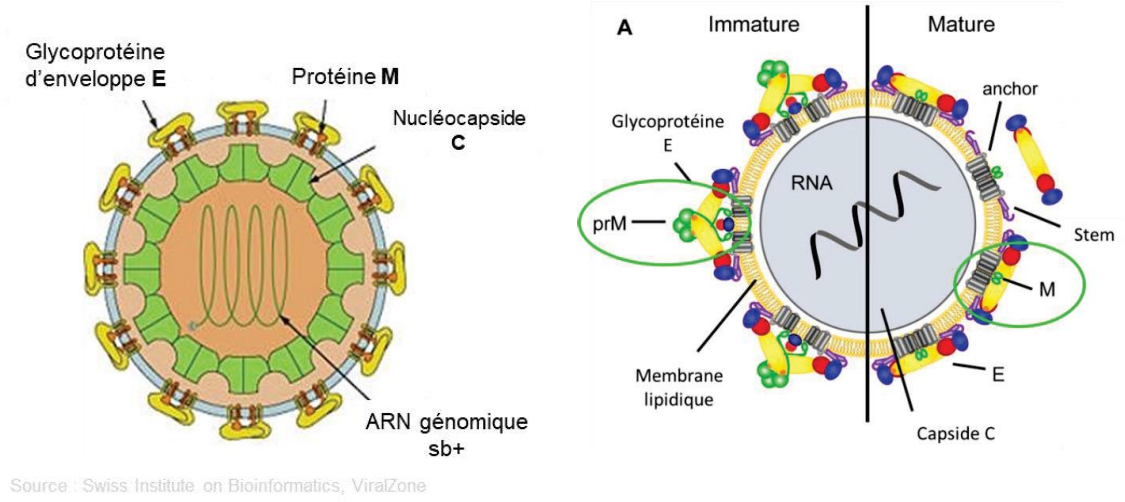


Figure 5: *Représentation schématique d'une coupe transversale de la particule virale WNV (DIAMOND M.S., 2008).*

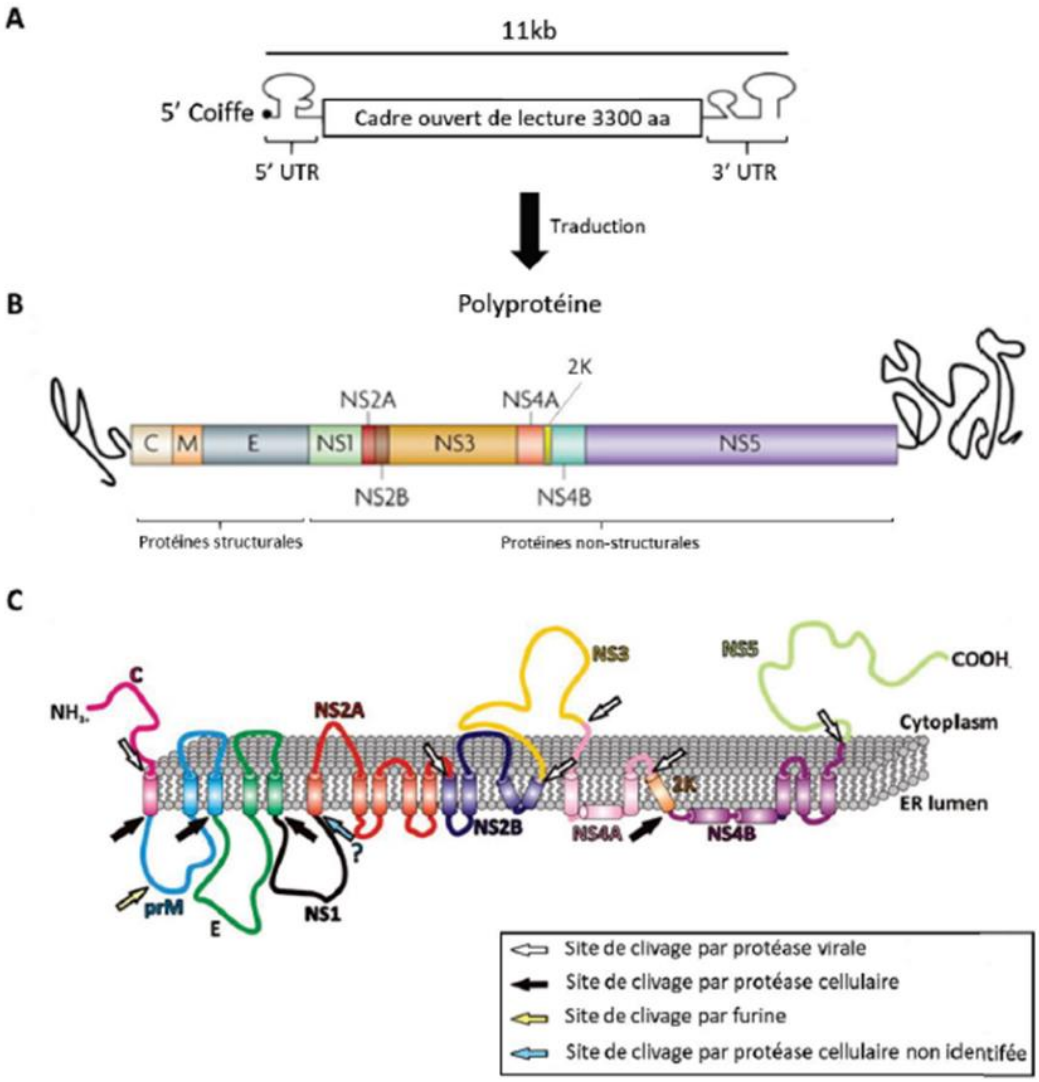


Figure 6 : *Organisation génomique du WNV(Furnon W. , 2018).*

2.2.3. Capacité de survie dans l'environnement.

La présence d'une enveloppe rend le WNV, comme d'autres Flavivirus, sensible aux solvants et facilement inactivé par la chaleur et par les désinfectants usuels (KNIPE D.M., 2013).

2.2.4.Cycle de réplication viral.

- Entrée du virus :

L'internalisation de la particule virale s'effectue après la liaison de la glycoprotéine d'enveloppe du virus aux récepteurs membranaires de la cellule hôte. Cependant, les récepteurs membranaires ne sont pas formellement identifiés mains, certaines molécules ont été identifiées comme récepteurs du WNV dont les héparane sulfate (HS), le Toll-like receptor TLR3, DC-SIGN (récepteur à lectine de type C), les TIM et TAM et les intégrines de type αvβ3(CHEN Y.,

1997).D'autres mécanismes mois spécifiques permettent au WNV et aux autres Flavivirus de pénétrer dans les cellules cibles.

Après introduction du virus par endocytose, une acidification permettant la modification conformationnelle de la protéine E aura lieux dans l'endosome (PIERSON T.C., 2013). Le peptide de fusion porté par E sera replié en épingle a cheveux et de ce fait, il y aura rapprochement des membranes virales et endosomales, entrainant ainsi la formation d'un pore qui permettra la sortie de la nucléocapside virale dans le cytoplasme **(Figure 7)**(Furnon W. , 2018).

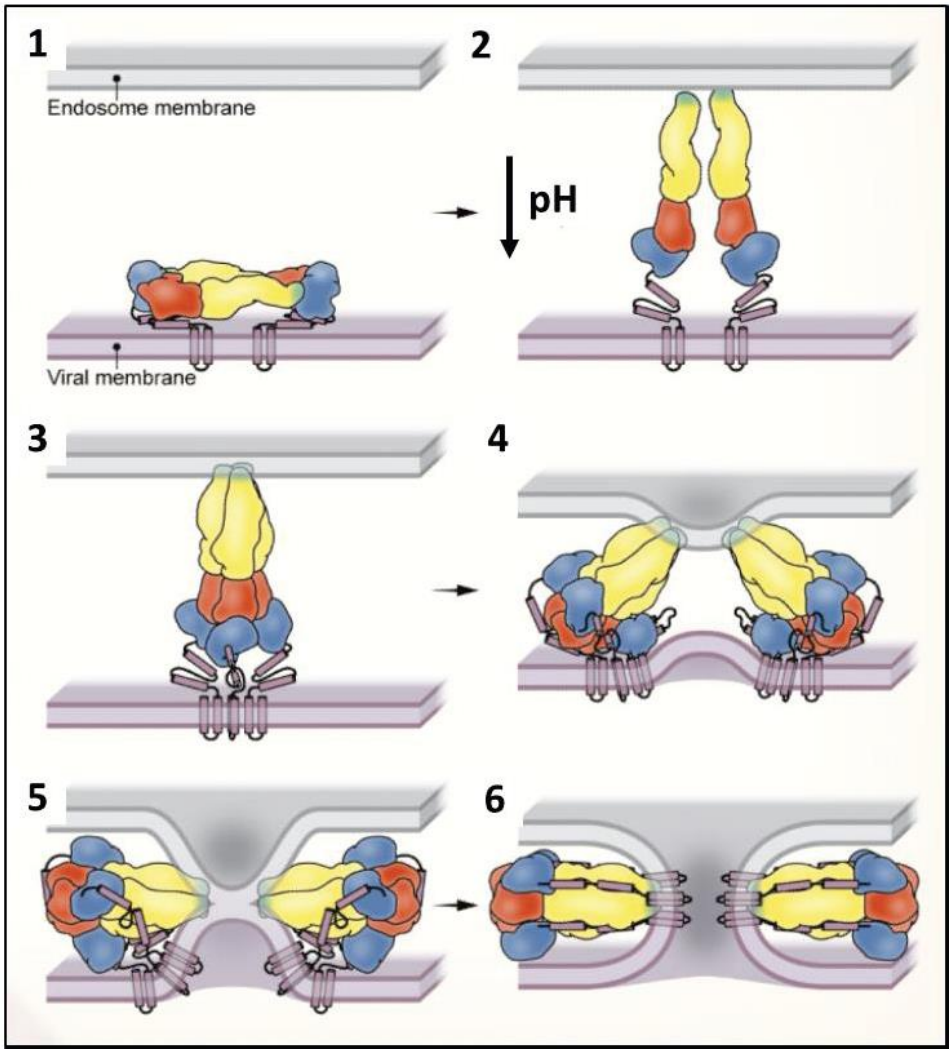


Figure 7 : *Mécanisme de fusion pH-dépendante de la membrane virale avec la membrane de l'endosome médié par la protéine E d'enveloppe(Furnon W. , 2018).*

- Etapes cytoplasmiques :

Après libération de la capside dans le cytoplasme, celle-ci va subir une dégradation qui va décharger le génome viral qui sera par la suite directement traduit. Cette traduction va permettre

de synthétiser une polyprotéine qui est le précurseur de multiples protéines virales matures. La synthèse et cela de façon co-traductionnelle après clivages par les protéases virale et cellulaires. Les protéines virales vont ensuite former au niveau du réticulum endoplasmique (RE), un complexe de réplication (RC).

La réplication au sein du (RC)débute par la synthèse d'un brin d'ARN de polarité négative (-)à partir de l'ARN génomique de polarité positive (+). L'ARN(-) va ensuite synthétiser de nombreux néo-Arn génomiques (+).Le bourgeonnement du virion au niveau du RE va permettre l'acquisition de l'enveloppe virale. Une fois que bourgeonnement a eu lieu, il y aura formation de particules virales immatures dont la maturation aura lieux lors du transit dans l'appareil de Golgi. Les virions matures seront par la suite expulsés de la cellule hôte par exocytose **(Figure 7)**(CECILE, 2018).

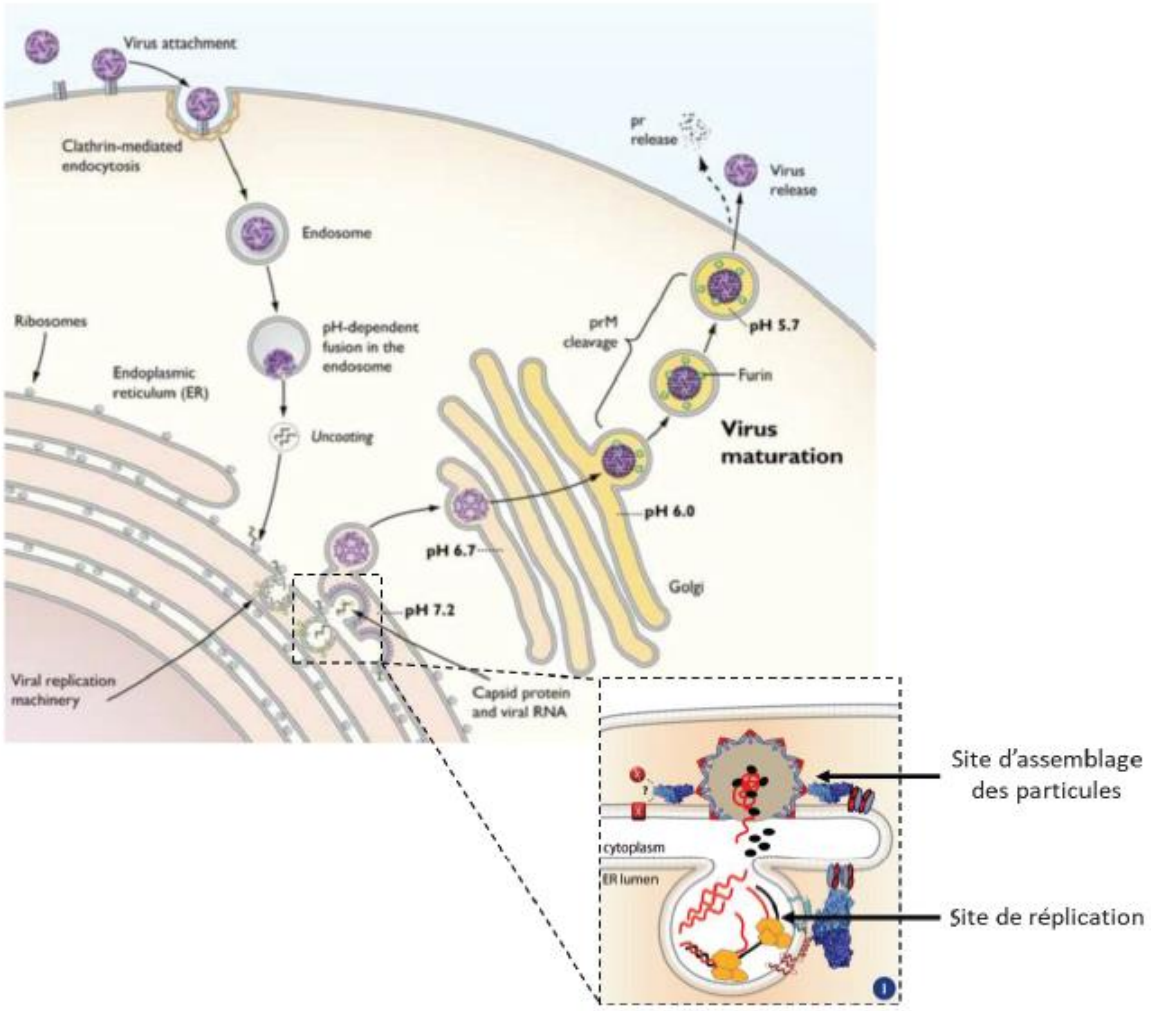


Figure 8 : *Représentation schématique récapitulative du cycle de multiplication virale du WNV(FURNON, 2018).*

2.2.5. Cycle de transmission du virus.

- ✓ Capacité vectorielle du virus.

Le virus du Nile occidental est transmis d'un hôte a un autre par l'intermédiaire d'un moustique de l'espèce culex pipiens en Europe et des espèces Culex quinquefasciatus et Culex tarsalis aux Etats-Unis(PETERSEN L. R., 2013).D'autres genre de moustiques comme le genre Aedes ou Mansonia peuvent également être porteurs du WNV sans permettre sa réplication ni sa transmission (KHAN S.A., 2017). Le cycle de transmission à ce vecteur implique un hôte aviaire qui est le réservoir naturel du virus et le principal hôte amplificateur permettant la circulation et la propagation du WNV (TAYLOR R.M., 1956).

L'infection du moustique a lieu après ingestion d'un repas sanguin sur un hôte présentant une forte virémie(titre viral > 10^5 UFP/ml)(GODDARD L.B., 2002). Le virus va ensuite se répliquer dans les glandes salivaires du vecteur et cela après avoir franchis sa barrière digestive (COLPITTS T.M., 2012). Le virus sera ensuite transmis à l'hôte (oiseau, mammifère...) lorsque ce dernier sera piqué par le moustique. En effet, le moustique infecté inspire le sang de l'hôte et injecte de la salive contenant les particules virales ainsi que des substances anti-inflammatoires qui vont empêcher la mise en place de la réaction inflammatoire immédiate (STYER L. M., 2011).

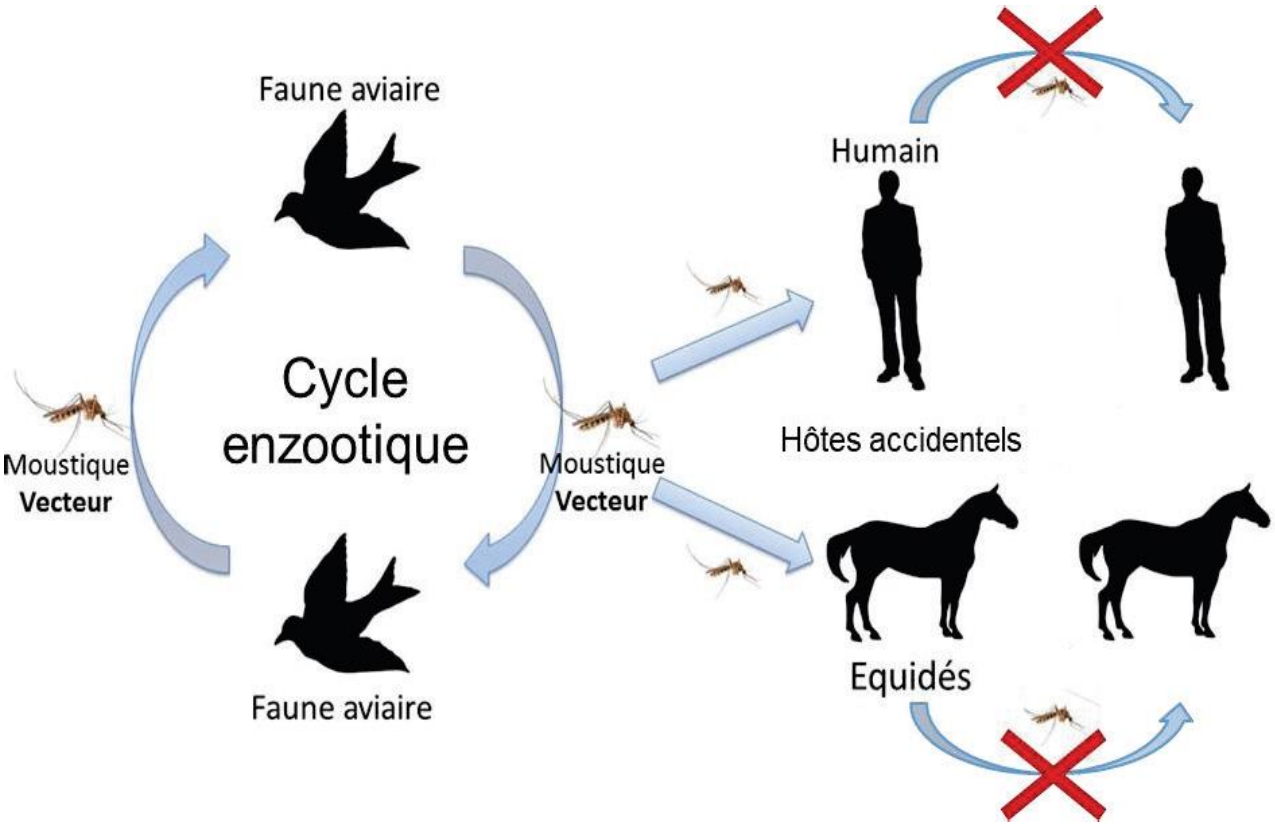


Figure 9 : *Représentation schématique du cycle de transmission du WNV.(Furnon W. , 2018)*

- ✓ Virémie et transmission du WNV entre les espèces.

La virémie ou charge virale détermine la présence et le taux des particules virales dans le sang d'un hôte. La quantification de la virémie est très importante chez l'espèce aviaire car c'est le facteur essentiel permettant d'explique la capacité de certaines espèces d'oiseaux, contrairement à d'autres, à contaminer un type de moustiques piqueurs de faible compétence vectorielle (A.C, 2009). En effet, il a été démontré qu'un taux de virémie élevé chez certaines espèces aviaires permettait l'infection des espèces de moustiques moyennement sensibles au WNV ainsi qu'une transmission plus efficace du virus au cours d'un repas sanguins (KOMAR N., 2003). Certaines études ont prouvé que la présence du vecteur en abondance dans certaines régions endémiques, ainsi que la forte circulation du WNV dans la population aviaire seraient à l'origine de l'infection d'individus appartenant à l'espèce humaine et équine (CIOTA A.T., 2013). Or, ces deux espèces hôtes ne développent pas une virémie suffisamment élevée qui permettra par la suite l'infection des vecteurs arthropodes lors de la prise d'un repas sanguin. De ce fait, l'homme et le cheval sont considérés comme des hôtes finaux ne permettent pas la propagation du WNV (CHANCEY C., 2015). D'autres animaux domestiques tel que les chiens et les chèvres au Sénégal ainsi que les chameaux, les moutons et les chèvres Au Nigeria ont

présenté à la sérologie des anticorps anti-WNV mais ont semblé ne jouer aucun rôle dans l'épidémiologie du WNV (DAVOUST B., 2016)(OLALEYE O., 1990). D'autres études ont démontré qu'environ 30 autres espèces animales étaient sensibles au virus et pouvaient de ce fait être infectées. Cependant seul quelques espèces comme les lémuriens, les grenouilles ainsi que les hamsters peuvent présenter des niveaux de virémie suffisamment élevés pour infecter les vecteurs arthropodes (VAN DER MEULEN KM., 2005).

- ✓ Transmission verticale.

Est définie par la transmission directe du virus du parent à la progéniture. Cette transmission est clairement démontré chez certains arthropodes dont les moustiques culicidae ainsi que les tiques Argasidae et Ixodidae(GODDARD LB., 2003). Cette caractéristique va permettre au virus de survivre dans des conditions climatiques extrêmes (REISEN WK., 2006).

- ✓ Transmission non-vectorielle.

Bien que ce mode de contamination soit très rare, les oiseaux peuvent généralement être contaminés après ingestion d'excréments ou de secrétions orales d'oiseaux porteurs du virus (KOMAR N., 2003). Certains oiseaux et vertébrés carnivores peuvent à leur tour être contaminés après consommation de viande contenant des particules virales (KOMAR N., 2003). En effet, il a été prouvé que des alligators qui ont consommés de la viande chevaline infectée présenteraient à leur tour une sérologie positive pour le WNV (MILLER DL., 2003). D'autres modes de contamination encore plus rares ont été observés dont les transfusions sanguines, les transplantations d'organes (PLANIZER CB., 2009), les autopsies d'animaux morts de la maladie du Nil occidentale(VENTER M., 2010),ainsi que la transmission intra-utérine du virus décrite pour la première fois en 2002 aux États-Unis(CDC, 2002). Et plus rare encore, la transmission du virus par l'allaitement (HINCKLEY AF., 2007).

3. Diagnostic de la maladie.

Le diagnostic clinique et épidémiologique va permettre de soupçonner l'éventuelle atteinte du sujet par le virus. Ce soupçon sera par la suite confirmé par le diagnostic de laboratoire.

3.1. Diagnostic clinique et épidémiologique.

Les signes cliniques permettant la suspicion du WNV chez l'homme et le cheval sont caractériels mais non pathognomoniques. Ils varient non seulement d'un pays a un autre mais aussi en fonction du contexte épidémiologique de la maladie (KARDJADJ M., 2019).

En effet, en Roumanie il a été décrit que les personnes âgées de plus de 15 ans présentaient de la fièvre, de la méningite ou de la méningo-encéphalite ainsi qu'un liquide Céphalo-rachidien clair (SIRBU A., 2011). En 2003, 40 ans après l'apparition des premiers cas cliniques en France, les symptômes évocateurs décrits ont été soit une soudaine fièvre suivie de manifestations neurologiques dont la méningite et l'encéphalite, ou bien une fièvre soudaine suivie de signes nerveux aigus atypiques (DEL GIUDICE P., 2004).

Aux États-Unis, le WNV a été classé en groupes de maladies neuro invasives ou le patient est atteint dans le premier groupe de méningites, d'encéphalite, de paralysie flasque aigue et d'autres dysfonctionnements neurologiques. Les individus du deuxième groupe quant à eux présentent des maux de tête, des myalgies, des parésies et/ou de la rigidité nucale, des arthralgies, des éruptions cutanées, des vertiges et des vomissements (LINDSEY NP., 2015).

Chez le cheval, il a été conclu d'inclure le WNV dans le diagnostic différentiel Lors d'apparition de syndromes nerveux aigus, d'ataxie, de faiblesse musculaire et de prostration. La suspicion du WNV peut avoir lieu lors d'apparition d'anomalies comportementales et de mortalités anormales chez l'espèce aviaire spécialement lorsqu'il s'agit de la famille des corvidés(KARDJADJ M., 2019).

3.2. Diagnostic de certitude.

Une grande variété d'outils permettant de diagnostiquer une infection au WNV sont disponibles. Les méthodes les plus employés sont la neutralisation virale (VRT), les tests d'immunofluorescence ainsi que les tests ELISA (BECK C., 2013).

La neutralisation virale ainsi que le test de séroneutralisation par réduction du nombre de plages de lyse (PRNT) sont considérés comme les tests sérologiques de référence pour le diagnostic du WNV. Le test est réalisé en suivant les protocoles standards consistants à la réduire le nombre de plages de lyse (PRNT) et cela en utilisant un seuil de réduction de 90% (PRNT90) qui représente la dilution du sérum contenant les anticorps viraux afin de quantifier les anticorps neutralisants contre le WNV. Ce test va permettre de quantifier visuellement et in vitro la présence des anticorps viraux ainsi que leur capacité de réduction du nombre de plages de lyses. Lorsque le seuil de 90% de plages de lyse en moins est atteint et cela après l'avoir comparé au contrôle qui ne contient aucun anticorps anti-WNV.

Il existe un test de micro-neutralisation virale qui est une modification du test PRNT qui permet de traiter un nombre important d'échantillons en utilisant des microplaques de culture cellulaire.

La VRT étant mois sensible que l'ELISA, elle ne permet donc pas de différencier entre les différentes espèces de Flavivirus (WEINGARTL H.M., 2003). L'obtention des résultats après avoir effectué ce test peut prendre 5 à 7 jours et de ce fait, lors d'épidémies les cas de WNV peuvent dériver en formes neuro invasives sévères (FURNON, 2018).

Le diagnostic de WNV par Elisa est souvent préféré du fait de la rapidité de détection des anticorps anti-WNV, de la sensibilité de la méthode ainsi que la disponibilité commerciale de kits prêts à l'emploi. Les tests ELISA habituellement utilisés sont la méthode ELISA compétitive, la méthode indirecte IgG ELISA ainsi que la MAC-ELISA ou les anticorps IgG sont captés (BECK C., 2013).

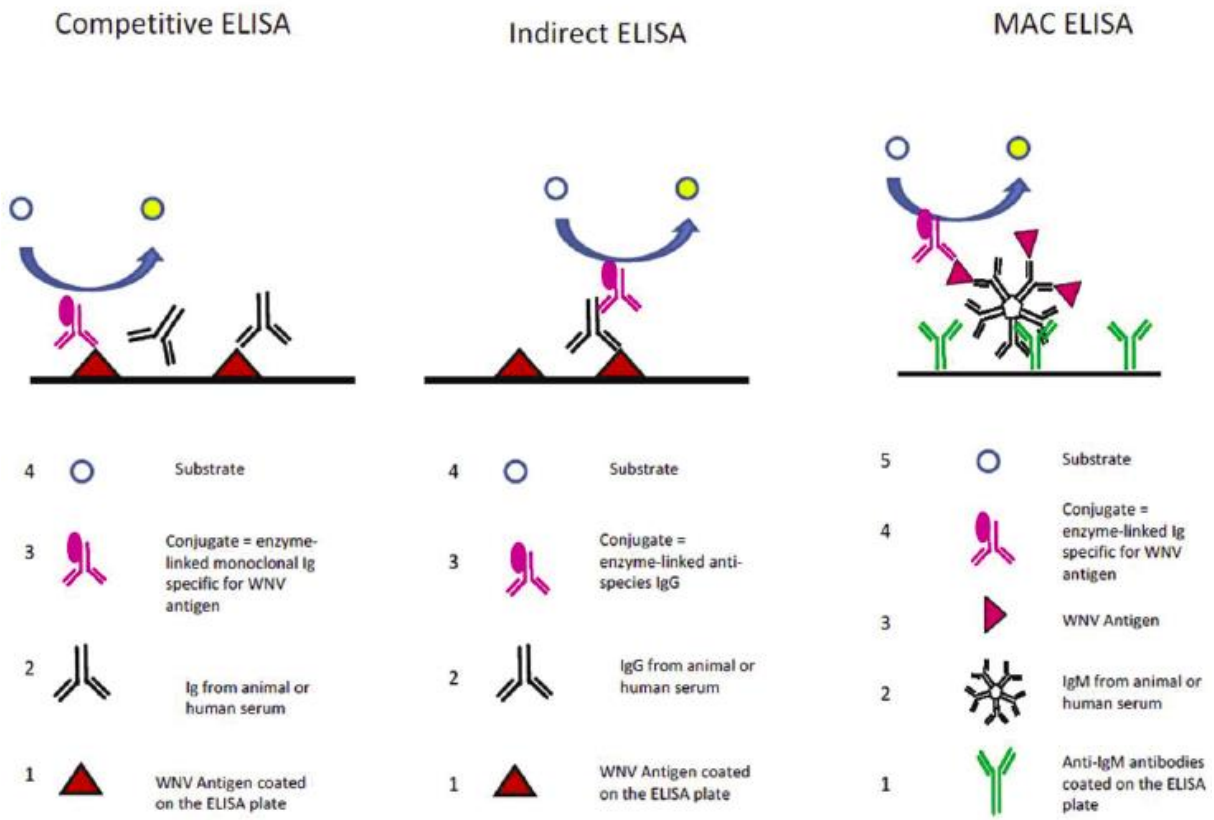


Figure 10: *Représentation schématique des méthodes ELISA les plus utilisées pour le diagnostic du WNV (BECK C., 2013).*

4. Prévention et mesure de lutte.

4.1. Traitement.

Il n'existe actuellement aucun traitement spécifique pour la fièvre du Nil occidental. Cependant, plusieurs études ont démontré que la Ribavirine était efficace pour traiter les individus atteints du VNO et cela en inhibant la réplication du virus (MORREY JD., 2002). Or, la molécule ne

semble présenter aucune efficacité contre les Flavivirus spécifiques des animaux (JW, 1989). De plus, il a été démontré que la survie des sujets atteints par la maladie n'avait aucune relation avec le traitement à la Rabavirine (CHOWERS MY., 2000).

Chez le cheval, le traitement symptomatique consiste à traiter les syndromes pseudo-grippaux. De ce fait, le cheval est mis sous perfusion, reçoit des injections d'anti-inflammatoires non stéroïdiens et/ou stéroïdiens avec éventuellement de la diméthylsulfoxide. Des mesures permettant une meilleure prise en charge de l'animal sont mises en œuvre et consistent à limiter les risques de chutes et d'automutilations (LECOLLINET S., 2014)

4.2. Vaccination.

Pour la population équine, trois vaccins ont reçu une autorisation de mise sur le marché en Europe et aux Etats-Unis. Ces trois vaccins sont l'Equip® qui est composé de virus inactivé associé à un adjuvent, l'Equilis® et le Proteq® qui sont des vaccins recombinants (Agency, 2015).L'efficacité de l'Equip® et du Proteq® contre les souches de la lignée 1 et la lignée 2 du WNV a été testée afin de prouver le développement d'une protection empêchant l'apparition des formes neuro invasives dues au virus (BECK C. a. a., 2013).

Forme vaccinale	Antigène	Mode d'administration
Vaccin inactivé et adjuvé Equip®	WNV inactivé Souche VM-2	2 injections a 3-5 semaines d'intervalle sur des chevaux âges de 6mois ou plus avec Rappel annuel
Virus canarypoxrecombinant et adjuvé Recombitek® West Nile (Etats-Unis), Proteq®West Nile (Europe)	prM-E	2 injections à 4-6 semaines d'intervalle sur chevaux d'âge > 5 mois Rappel annuel
Vaccin chimérique recombinant inactivé et adjuvé Squelette du YFV, souche vaccinale 17D comportant les gènes prM-E du WNVEquilis® West Nile	prM-E	2 injections à 3-5 semaines d'intervalle sur chevaux d'âge > 6 mois Rappel annuel

***Tableau 1** : Description des vaccins équins WNV (CECILE, 2018).*

I. Déroulement général de l'étude.

1. Objectif de l'étude.

La West Nile est une maladie virale transmise aux chevaux par piqures de moustiques ceux-ci s'infectent auprès d'oiseaux malades et porteurs, qui représentent le réservoir du virus. C'est une maladie réglementée qui fait l'objet d'une surveillance épidémiologique et d'une gestion spécifique en cas de cheval positif. Le fait que des anticorps anti-WNV aient été retrouvés chez cette espèce permet simplement d'arriver à la conclusion que celle-ci y est réceptive.

Afin de connaitre le statut sanitaire de cette maladie et de confirmer la présence de ce virus sur les territoires algériens, une étude de la prévalence a été menée dans la Wilaya d'Alger.

Un accord a été donc conclu entre des praticiens vétérinaires, des éleveurs de chevaux et des propriétaires de centres équestres afin de collecter des prélèvements sur le terrain qui ont été par la suite analysés et dont les résultats ont fourni la matière de ce master.

Le choix de la région d'Alger a été établi du fait que le climat de cette région soit favorable à la multiplication du vecteur (humidité, chaleur en été et fortes précipitations en automne), de la présence de points d'eau (lacs, marécages etc.) et d'élevages de chevaux.

2. Présentation de la problématique de recherche.

Lors du lancement de cette étude en automne 2019 et au début de l'hiver 2020, il s'agissait d'une exploration visant à faire le sondage de la WNV dans la population équine de la région de l'algérois. Les problématiques qui se sont posés sont les suivants :

A. Le virus de la WN circule-t-il dans la population équine de la wilaya d'Alger ?

Le virus de la West Nile est toujours d'actualité, sa circulation dans le monde et dans le bassin méditerranéen est toujours maintenue notamment au nord Africain. Le manque de données sur la circulation du virus en Algérie, et la prévalence des chevaux, ont pousse a faire cette étude afin de connaitre l'état sanitaire vis-à-vis du virus de la West Nile en Algérie, plus précisément dans la Wilaya d'Alger et ses environs.

B. Quels sont les facteurs de risques du virus de la West Nile ?

L'analyse des échantillons a révélé que les anticorps anti-WNV sont effectivement présents chez quelques chevaux de la Wilaya d'Alger.

Cette information a permis de se poser la question sur les facteurs de risque afin d'évaluer l'étendue de la maladie.

3. Schéma de l'étude et les caractéristiques des sujets de l'échantillon.

A. Schéma général de l'étude :

L'étude sur le terrain a eu comme objectif d'évaluer la présence du virus dans les environs d'Alger pendant les saisons de séroprévalence contre le virus de la West Nile

Ces saisons sont l'automne et du début de l'hiver car le vecteur a connu une multiplication maximale tout au long du printemps et de l'été, ce qui a augmenté les prises de repas sanguins sur les chevaux et de ce fait la transmission du virus a l'hôte équin.

Cette étude s'est déroulée en trois étapes différentes qui sont le prélèvement d'échantillons sanguin dans différents endroits de la wilaya, l'analyse de ces derniers par un test Elisa et enfin l'interprétation des résultats selon différents facteurs de risque.

B. Définition de la population étudiée :

Sur le terrain, l'unité d'étude était l'ensemble de la wilaya d'Alger et spécialement les zones non loin des points d'eau. La population ciblée était la population de chevaux de la wilaya préférentiellement les chevaux d'élevage en semi-stabulation qui sortent en journée et ne rentrent qu'après le coucher du soleil car ils sont le plus exposés aux piqures de moustiques, ainsi que les chevaux d'importation présents dans les centres équestres.

II. Matériels et méthode

1. Réalisation du questionnaire

Le questionnaire a été réalisé en se basant sur :

- La géo localisation, la zone-lieu, sur la présence de lacs, et d'humidité
- L'âge / la robe / la race / le sexe / caractéristiques du cheval
- L'état sanitaire du cheval (vermifugation, vaccination) son état général et ses antécédents médicaux
- Sur l'origine du cheval, lieu d'acquisition
- Sur ses déplacements, comme les déplacements dans les zones humides, ou les zones marécageuses
- L'habitat du cheval, en stabulation ou en semi stabulation
- L'activité du cheval
- Présence des vecteurs, moyen de lutte contre les vecteurs
- Présence d'oiseaux.

Toutes ses questions complétées au moment du prélèvement du cheval nous ont permis d'avoir une idée général sur l'animal qu'on prélève, sur son âge, son sexe, son état sanitaire, mais aussi s'il présentait des symptômes en relation ou non avec la Wn.

Les prélèvements ont été faits sur des chevaux de différentes régions d'Alger, dans des centres équestres mais aussi chez des particuliers.

Ce questionnaire a un but aussi de récolter des données épidémiologiques collectives, c'est-à-dire, à plus nous renseigner sur l'habitat des chevaux, l'état sanitaire des écuries, la présence ou non d'ouvertures permettant l'accès facile aux vecteurs ou aux réservoirs, sur la présence à proximité de zones marécageuses, de lacs, de mer.

Figure 1: *L'habitat des chevaux prélevés.*

Figure 2 : *Les conditions hygiéniques de l'habitat des chevaux.*

A chaque cheval prélevé, ce questionnaire était réalisé, avec la collaboration des propriétaires qui nous ont beaucoup aidé et faciliter le travail.

Une fois les prélèvements réalisés, il est codé, daté, et protégé dans une glacière, avant son acheminement vers le laboratoire.

L'étude s'est étendue de septembre à décembre 2019, ce qui correspond à l'automne.

Le choix de cette période de l'année correspond à l'automne, car les vecteurs sont surtout présents en été et c'est durant cette période-là que les chevaux se font le plus piquer, après cette période, les taux d'anticorps commencent à augmenter, en automne on peut alors avoir un taux très élevé d'anticorps dans le sang, prennent environ 45 jours.

2. Délimitation des zones.

L'étude de la séroprévalence de la WN, a été réalisée sur des chevaux résidants dans plusieurs régions d'Alger et ses environs.

Le choix des régions a été surtout choisi autour des zones marécageuses et humides d'Alger, les lacs, les marais étant l'endroit de regroupement des oiseaux migrateurs, principal réservoir de la WN, ses zones humides sont propices à la propagation du virus.

Les chevaux vivant à proximité de ses zones, des deux sexes, qu'ils soient symptomatiques ou asymptomatiques sont prélevée, et représentent un échantillon représentatif a l'étude de séroprévalence de la WN.

Les régions ou les cheveux ont été prélevé sont la région de l'Est, de l'Ouest

L'est d'Alger : Boudouaou marine, Ben Rahmoune, OuledHeddaj, Hammedi

L'ouest d'Alger : Ouled Fayet, Bouchaoui, Les grand Vents.

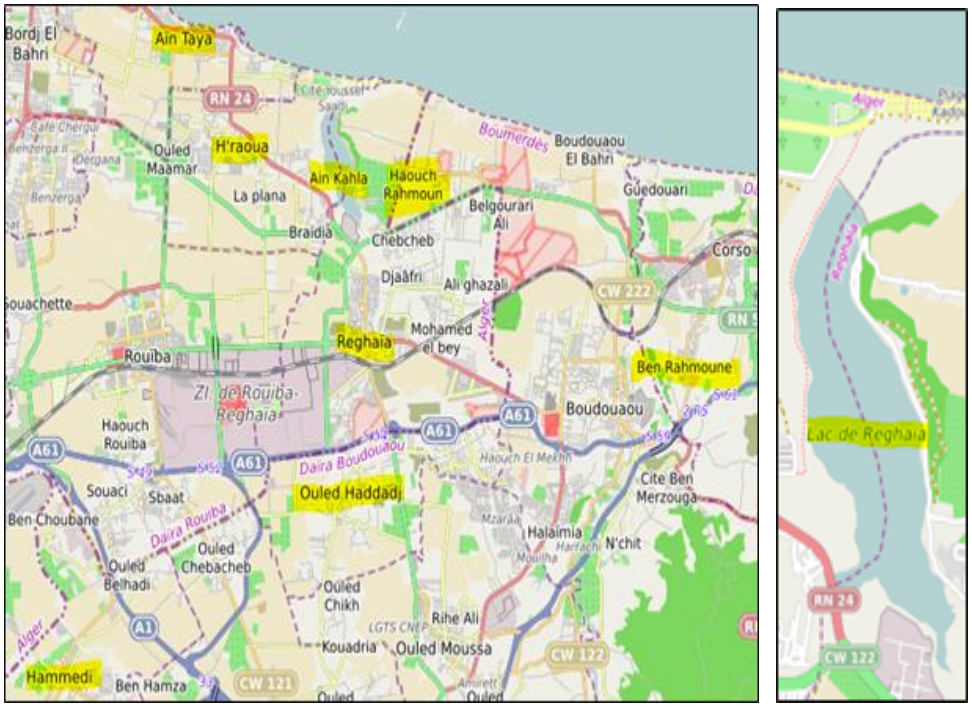


Figure 3: *Région Est et le lac Reghaia a proximité*

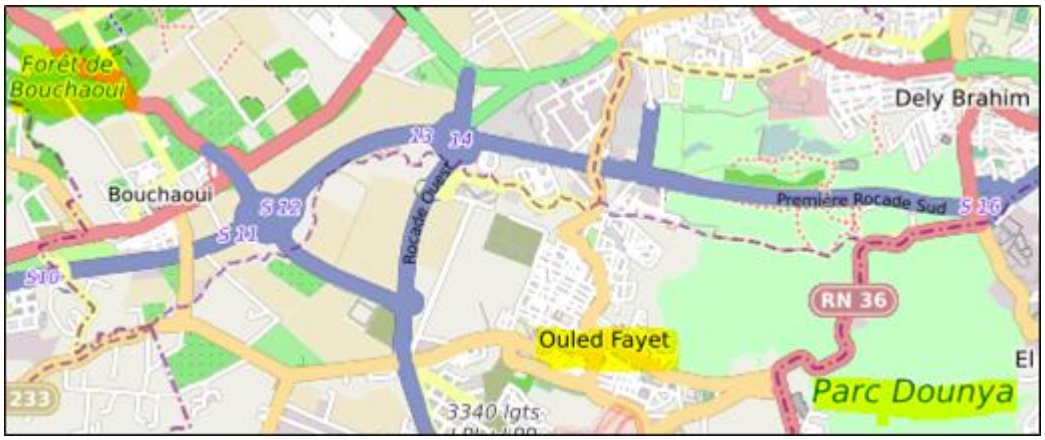


Figure 4: *Zone ouest avec le lac du parc Dounia a proximité*

3. Prélèvement de sang.

- Trousse de prélèvement de sang.
- Prélèvements réalisés sur du sang veineux a partir de la veine jugulaire.
- Glacière, avec des poches a glaces
- Tube sec vacutainere
- Porte tubes
- Aiguilles types vacutainere
- Porte aiguille type vacutainere
- Compresse/ coton stériles
- Alcool 95 degrés

Figure 5:*Matériels utilisé pour prélèvement sanguin*

3.1. Etapes de prélèvement sanguin

Après avoir complété le questionnaire avec le propriétaire, on passe au prélèvement sanguin, généralement le propriétaire nous fait la contention du cheval, afin qu'on puisse le prélevé.

- On commence par imbiber un coton avec de l'alcool
- On cherche la veine jugulaire, une fois trouvée on essuie la gouttière jugulaire avec le coton stérile imbibé d'alcool
- On exerce ensuite une pression avec le pousse sur la gouttière jugulaire, de cette manière la veine se remplie au niveau du pousse et ressurgit, de façon qu'on puisse bien la délimiter
- A l'aide d'un adaptateur avec l'aiguille insérée on pique la peau au niveau de la veine, plus précisément au niveau du tiers supérieur de la veine jugulaire
- L'aiguille dans la veine est la compression est toujours maintenu
- On insère le tube dans l'aiguille avec la main gauche, et on attend que le sang aspiré remplisse le tube
- Une foi le tube remplie on le retire de l'aiguille, puis on retire l'aiguille de la veine et on passe un coton sec et on exerce une pression quelques minutes pour l'hémostase.
- Un numéro correspondant à chaque cheval prescrit est ensuite écrit sur le tube a marqueur indélébile
- Le tube est tout de suite mis dans la glacière afin qu'il puisse être protégé de tout altération

Une fois tout le prélèvement fait, et mis dans la glacière, dans les portes tubes, on peut alors les acheminer vers le laboratoire, cette opération doit être rapide, car plus on met du temps à les acheminer vers le laboratoire plus on risque une altération des prélèvements, ce qui risque de fausser les résultats.

Figure 6: *Prélèvements sanguin à partir de la veine jugulaire.*

Figure 7:*Protection des tubes remplis de sang dans une boite, dans une glacière.*

3.2. Acheminement des prélèvements vers le laboratoire.

Une fois avoir acheminée tous nos tubes au laboratoire, on commence la centrifugation, on place les tubes remplis de sang dans la centrifugeuse, et on centrifuge a une vitesse de 3000 tours/min durant 10 minutes.

Cette étape permet de séparer les composants cellulaires : le culot avec les globules rouges, globules blancs et plaquettes des composants non cellulaire : le surnageant le plasma et le sérum.

Figure 8: *Centrifugation des tubes remplis de sang dans la centrifugeuse.*

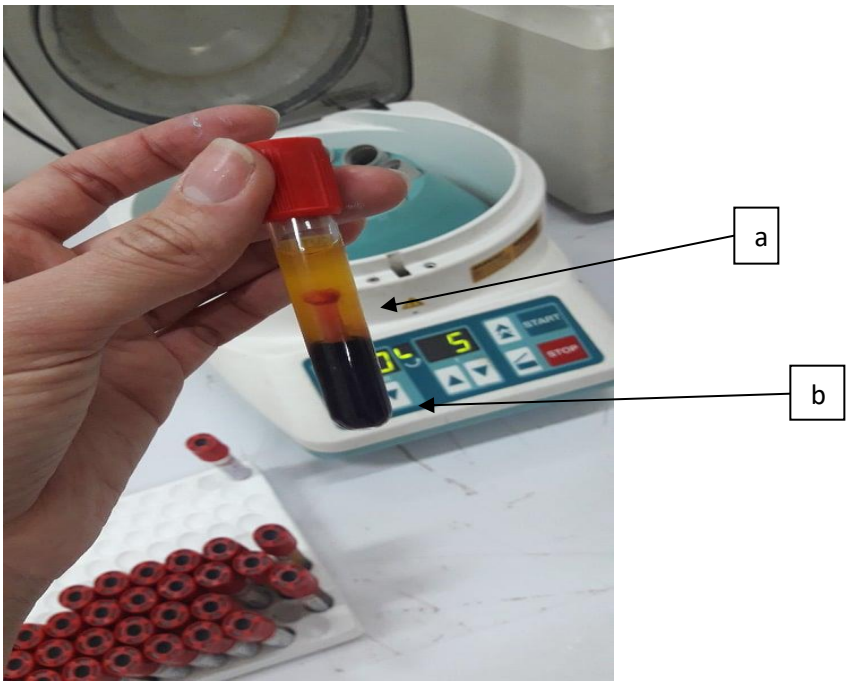


Figure 9:*Tube sanguin après centrifugation séparation du sang en deux phases : a : plasma, b : le culot.*

Après la centrifugation et la séparation des éléments sanguin, on prélève le sérum, avec une micropipette avec embout, le sérum est ensuite transféré dans les Eppendorfs, on code chaque Eppendorfs correspondant au code du tube.

La dernière étape consiste à mettre en congélation (-18 degrés) tous les Eppendorfs contenant le sérum, ceci permet de les protéger durant une longue période avant de passer au test.

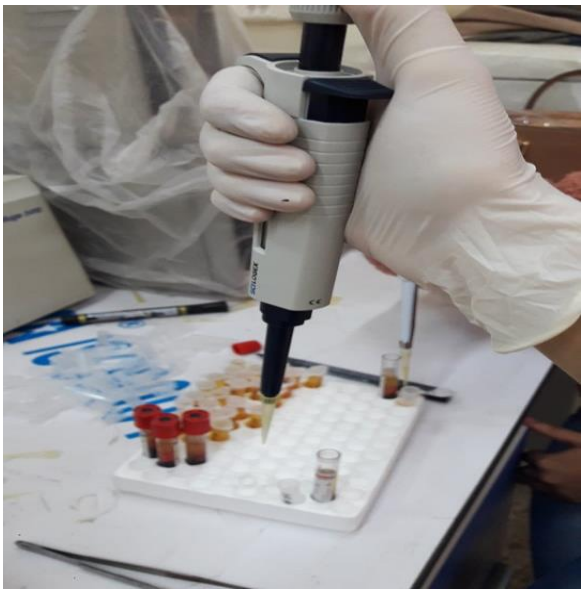


Figure 10:*Prélèvement du sérum après centrifugation*

4. Test ELISA.

Le test ELISA est un test immunologique qui permet de détecter des anticorps (Ac) a la West Nile, secrétée par l'équidé en réponse immunitaire à l'affection par le virus, la technique ELISA fait donc partie des tests sérologiques recommandé par l'OIE.
Le kit ELISA : ID Screen® West Nile Competition, fait partie des kits commercialisés et utilisés pour le diagnostic de la West Nile, ou comme un certificat lors d'exportation des équidés, selon les recommandations de l'OIE.

4.1. Description du test.

ID Screen® est un test de diagnostic sérologique compétitif, permet de détecter les Ac dirigés contre la protéine d'enveloppe pr-E de la WN retrouvés dans le sérum des équidés infectés par le virus.
Chaque kit contient une barre avec 8 puits, au fond chaque puits est déjà fixé un antigène (extrait purifié du virus)
Les échantillons à tester sont dilués, puis prélevé et versés dans les puits, si les anti-pr-E sont présent dans les échantillons il y a formation d'un complexe antigènes-anticorps.
Un Ac anti-pr-E de détection (PO) couplé à une enzyme (la peroxydase) est ensuite rajouté dans les puits, cet ac de détection se fixe aux anti-pr-E resté libre, pour former un complexe antigènes-anticorps-PO.

Après un dernier lavage, et élimination d'excès d'aAc, une solution révélatrice est rajoutée dans les puits, cette solution contient un substrat incolore de l'enzyme (TMB).
Une réaction chimique se produit, lié à la fixation du substrat a peroxydase fixé à l'anticorps de détection fait apparaitre une coloration bleue.
La coloration bleue, indique la présence l'AC- anti-pr-E, l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration d'ac, mesurable au spectrophotomètre, la lecture est réalisée à une longueur d'onde de 450 nm.

4.2. Composition du kit ELISA

- Microplaque contenant des puits, sensibilisé a l'antigène purifiée
- Conjugué concentré 10X
- Contrôle positif
- Contrôle négatif
- Tampon de dilution
- Solution de lavage concentrée 20X
- Solution de révélation TMB
- Solution d'arrêt (H_2SO_4 0.5M)

4.3. Matériels de laboratoire

- Gants/ lunette de protection.
- Micropipette.
- Embouts en plastique jetables.
- Récipients cylindrique graduées.
- Tubes a essaie ou des plaques non revêtu d'antigènes.
- Eau déminéralisée ou distillée.
- Papier essuie-tout.
- Flacon de lavage.
- Dispositifs multicanaux pour lavage manuel, ou laveur automatique.
- Minuteur.
- Spectrophotomètre a absorbance avec filtre 620, 630 ou 650 nm.

4.4. Mode opératoire

1. Ramener les sérums, les 3 réactifs, et les microplaques a température ambiante avant l'emploi, homogénéisation des échantillons de sérums par retournement ou par vortex.
2. Préparation des microplaques en les retirant de leurs emballages, les numéroter en haut de chaque bande pour une bonne orientation.
3. Préparation de la solution de lavage concentré a 20X à température ambiante 21 degrés +/- 5 degrés, bien l'agiter afin de dissoudre les cristaux qui se forment à l'intérieur.
4. Dilution au 1/20ème du produit avec de l'eau distillé pour obtenir une solution de lavage 1X
5. Prélever à la micropipette dotée d'embout à usage unique en plastique et jetable
    - 50µl de tampon de dilution 2 dans chaque puits.
    - 50µl de contrôle positif dans les cupules A1 et B1.
    - 50µl de contrôle négatif dans les cupules C1 et D1.
    - 50µl de chaque sérum a testé dans les cupules restantes.
6. Incuber à température ambiante (21 degrés +/- 5 degrés) pendant environ 90mins
7. Laver manuellement 3 fois chaque cupule avec 300µl de solution de lavage 1X (préalablement préparée auparavant)
8. Incuber de nouveau à température ambiante durant 30 mins +/- 3 mins
9. Distribuer dans chaque cupule 100µl de solution révélatrice
10. Incuber à température ambiante 21 degrés durant 15 mins dans l'obscurité
11. Distribuer 100µl de conjugués 1X (préalablement préparée) dans chaque cupule.
12. Distribuer 100µl de solution d'arrêt dans chaque cupule, afin de bloquer la réaction.
13. Mesurer la densité au spectrophotomètre a densité 450nm, puis enregistrer les densités dans un lecteur d'ELISA, de microplaques à 96 puits.

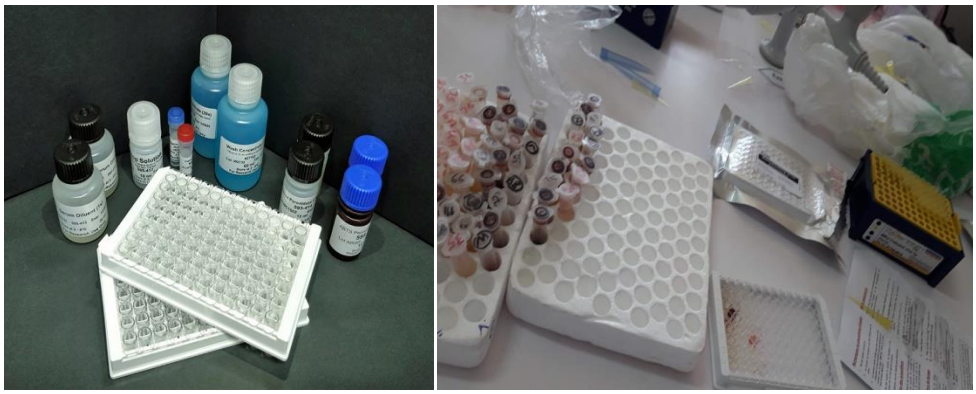


Figure 11 : *Kit ELISA ID SCREEN®, amener les réactifs, les microplaques et les sérums a température ambiante, et numéroter les microplaques.*

Figure 12: *Lavage avec la solution de lavage 1X figure : distribution du conjugué 1X*

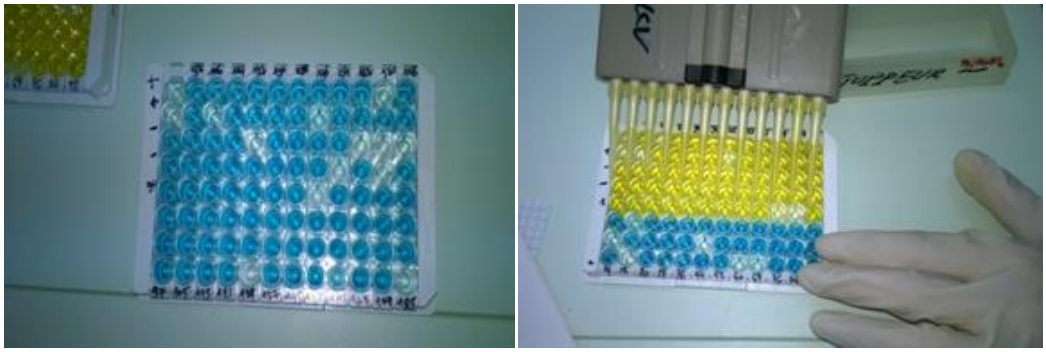


Figure 13 : *Plaque après incubation avec la Solution de Révélation coloration du substrat Passage de l'incolore au bleu.*

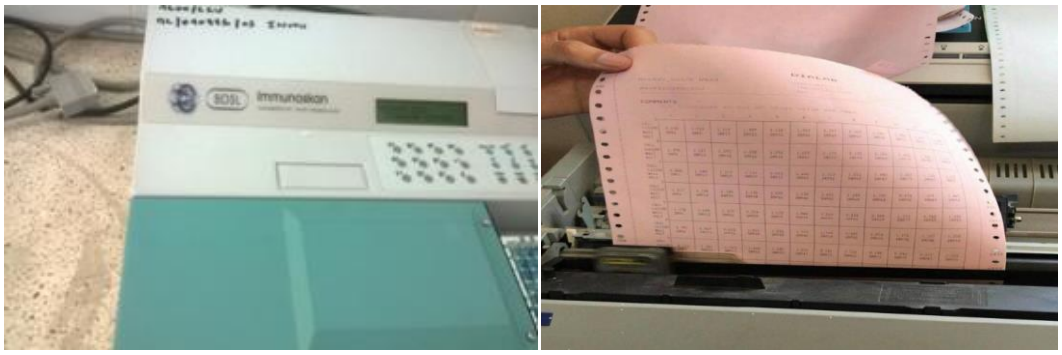


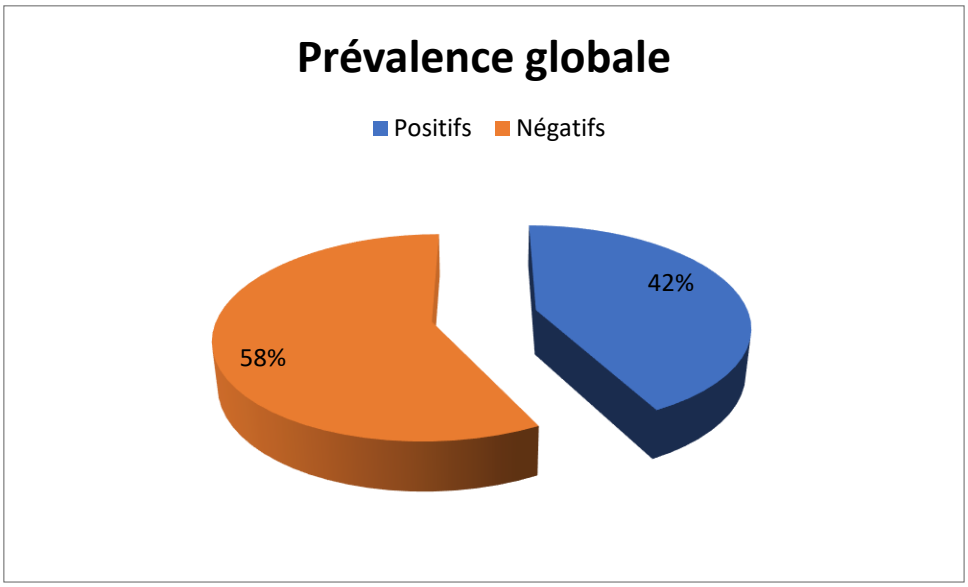
Figure 14: *Lecture et Calcul des densités au spectrophotomètre. ELISA*

IV. Résultats obtenus dans le cadre de l'étude du Virus West Nile et discussion :

Les résultats sont obtenus après lecture au spectrophotomètre afin de déterminer le nombre de séropositifs au WNF ainsi que le nombre de négatifs. Ces résultats sont par la suite insérés dans un fichier Excel afin d'étudier les prévalences selon la région étudiée (région Est et région Ouest) ainsi que la prévalence propre à chaque individu (âge, sexe).

1. Séroprévalence globale

Sur une population composée de 151 chevaux, 64 d'entre eux sont séropositifs au test ELISA compétition à la FNO, ce qui représente un taux de prévalence d'environ 42.38%%, ces proportions sont obtenues en application du logiciel Excel



Il faut savoir quel que soit le kit ELISA utilisé (comme avec tous les kits commerciaux disponibles actuellement), il a pour qualité première la sensibilité. Pour la spécificité du test

ELISA dit "de compétition" utilisé dans cette étude, il est supposé permettre en effet de diminuer l'apparition de réactions faussement positives par fixation non spécifique des Ac équins sur les protéines virales, car des réactions croisées peuvent survenir avec les virus du même séro-complexe de la famille des *Flaviviridae*, genre : *Flavivirus*.

Le résultat de notre étude a montré une séroprévalence de 42.3% beaucoup plus élevée par rapport à la seule étude effectuée chez l'espèce équine en Algérie, ou Bouacida-Younes et al.(2018) avaient retrouvés un taux d'infection de 12% sur un total de 188 chevaux (Bouacida-Younes et al., 2018). Notre résultat est plus élevé que celui retrouvé en Tunisie et en Serbie ou des prévalences de 27.311% et de 28.6% ont été observées respectivement (Hassine et al., 2011 ; Medic et al., 2014). Cette forte prévalence de la maladie suggère une forte circulation virale du virus WN dans la wilaya d'Alger.

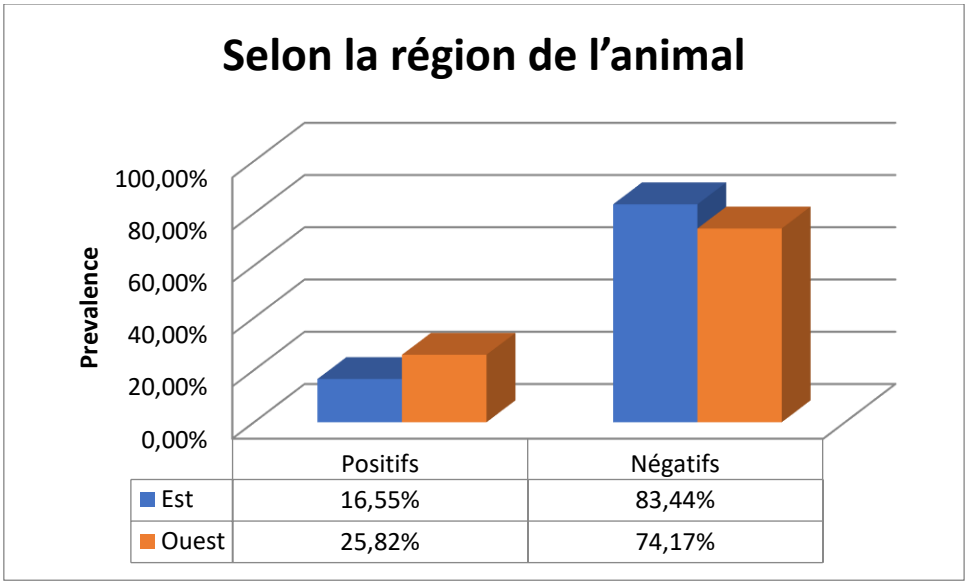
Peu de données existent dans la littérature sur la cinétique des anticorps vis-à-vis du virus de West Nile chez le cheval (Leblond et al., 2005). Il serait intéressant de poursuivre le suivi de cohortes de chevaux positifs afin de préciser la durée de leur détection en condition d'infection « naturelle ».

2. Prévalence de la WNF selon la région étudiée :

Les échantillons ont été prélevés dans deux zones de la wilaya d'Alger qui sont :

- ***La zone Est d'Alger*** : Boudouaou Marine, Ben Rahmoune, OuledHeddadj, Hammedi, Reghaia, HaouchRahmoune, Ain Kahla, H'raoua et Ain Taya.
- ***La zone ouest d'Alger*** : Ouled Fayet, Bouchaoui et Delly Ibrahim.

Les résultats de la séroprévalence selon les régions diffèrent selon que les chevaux soient de l'Est d'Alger ou de l'Ouest. En effet nous avons constaté que sur l'ensemble de la population équine prélevée, 16.55% (25/151) présentaient des anticorps anti-Virus WestNile dans la région Est et 25.82% (39/151) dans la région Ouest.



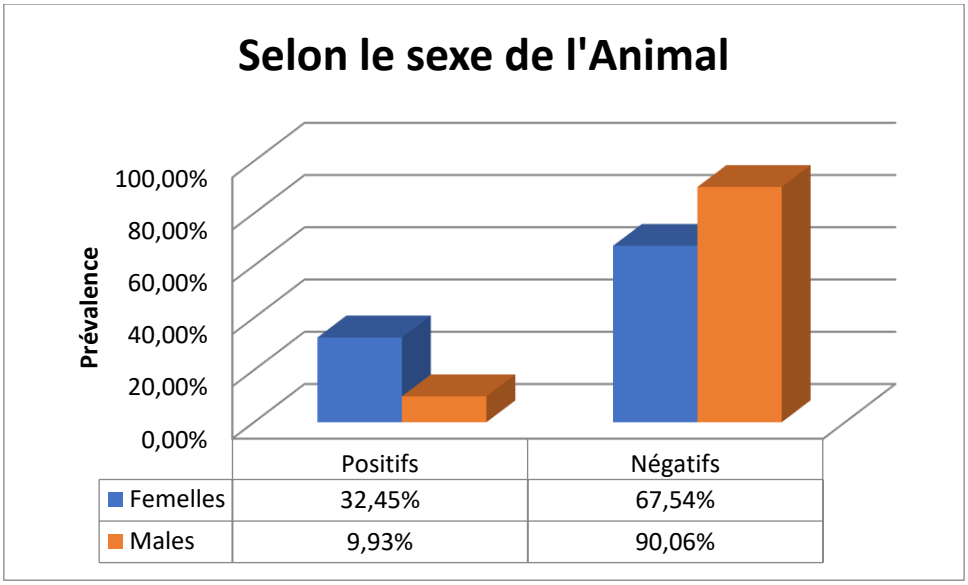
Les deux zones (Est et Ouest) semblent être infectées de façon similaire, puisqu'il n'y a presque pas de différence dans la positivité des chevaux atteints. Il faut dire que les deux zones bénéficient d'un climat relativement humide, due principalement à la présence des deux lacs, celui de Reghaia à l'Est et celui de Parc Dounia à l'Ouest.

Il semble que les chevaux séropositifs seraient présents dans des zones de proximité des flux migratoires, en présence d'oiseaux migrateurs, en zones humides et moins humides. La présence des Lacs augmente le risque de contamination des chevaux par le Virus West Nil, puisque ce dernier se transmet par voie vectorielle, plus particulièrement par le moustique (Culex et Aedes) (Bouacida-Younes et al., 2018), dont l'eau est le milieu favorable à la prolifération de ces derniers.

3. Etude des facteurs de risque individuels :

3.1. Selon le sexe de l'animal :

Les résultats de notre étude montrent que les femelles ont un taux d'infection assez élevé de 32.45% (49/151) par rapport à celui des males qui est de 9.93% (15/151).

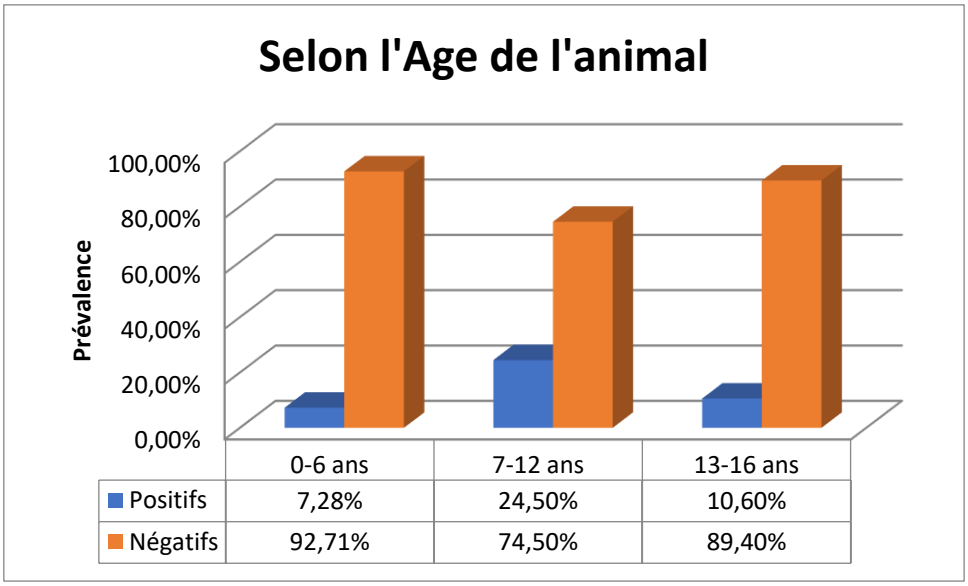


	Positifs	Négatifs
Femelles	32,45%	67,54%
Males	9,93%	90,06%

Pour expliquer ces résultats, il semble que le virus West Nil dans cette étude soit sélectif vis-à-vis des sexes. Les femelles semblent contracter le virus beaucoup plus que les males.

3.2. Selon l'âge de l'animal :

Dans cette étude, les chevaux sont repartis en 3 catégories d'âge. Les chevaux âgés entre 0-6 ans, 7-12 ans et 13-16 ans.



	0-6 ans	7-12 ans	13-16 ans
Positifs	7,28%	24,50%	10,60%
Négatifs	92,71%	74,50%	89,40%

Selon nos résultats, il semblerait que dans cette étude l'âge soit un facteur prédisposant à une infection au Virus West Nil. Car les chevaux âgés de 7 à 12 ans sont les plus sujets à développer l'infection et à avoir un taux d'anticorps important dans le sang. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que cette catégorie d'âge est plus active, car ces chevaux sont plus utilisés

dans diverses activités sportives et de loisirs, et par conséquent plus exposés aux piqures d'insectes.

V. Conclusion et recommandations.

Selon les résultats de cette enquête sérologique, la présence de la fièvre du Nil Occidental est confirmée par le test ELISA de ''competition'' IgG, avec un taux de prévalence d'environ 12% sur une population de 151 chevaux dans les clubs hippiques et chez les particuliers. Cependant, même si la prévalence paraît faible, le risque d'apparition d'une épidémie d'arbovirose émergente /ré-émergente n'est pas à mis à l'écart en raison du changement climatique.

Il semble que les chevaux séropositifs seraient présents dans des zones de proximité des flux migratoires, en présence d'oiseaux migrateurs, en zones humides et moins humides, et même en présence de moyens de lutte anti-vectorielle. Toutefois, beaucoup de paramètres sexe, âge, race, activité sont à reconsidérer pour une étude ultérieure en élargissant davantage la population avec des proportions homogènes.

Les chevaux constituent en fait des révélateurs épidémiologiques de la circulation du VNO et du vecteur dans les régions étudiées. Pour l'heure, cette maladie est en train de prendre de l'ampleur dans le pourtour méditerranéen et dans d'autres régions du monde. Il y a observation d'un phénomène qui évoluerait à bas bruit dans le nord algérois chez ces révélateurs épidémiologiques, mais pas à conclure d'un caractère émergent de cette zoonose vectorielle.

Sur le plan vétérinaire, il parait donc essentiel, d'instaurer des moyens de diagnostic de routine pour l'identification de la WNF. Sachant que le VNO entraîne des méningites et méningo-encéphalo-myélites chez le cheval comme chez l'homme, l'inscription du diagnostic sérologique dans le cadre de recherche obligatoire au niveau des services des maladies infectieuses des hôpitaux de notre pays est souhaitée afin que les mesures nécessaires soient prises pour la protection de la santé humaine et animale.

De manière plus générale, différents axes de recherche sont envisagés dans le but d'améliorer notre connaissance du cycle épidémiologique et de l'identité de vecteurs locaux. Pour cela il faudrait rechercher autour des exploitations des indicateurs de présence et de densité d'espèces d'oiseaux candidates soit à l'introduction du virus (oiseaux migrateurs), soit à son amplification ou à sa diffusion (espèces locales non-migratrices).

Le virus West Nile, arbovirus de la famille des Flaviviridae, est transmis à l'homme essentiellement par les piqûres d'insectes infectés. Compte tenu du cycle biologique du virus, la maladie est saisonnière et ne se manifeste cliniquement que pendant l'été et l'automne. Bien que des différences génétiques entre souches aient été mises en évidence, il semble que peu de divergences antigéniques sont décrites et que les souches partagent de nombreux épitopes, quelles que soient les régions du monde où elles sont isolées.

En première approximation, en période estivale, la quasi-totalité de l'hexagone est susceptible de permettre la circulation virale pendant des périodes plus ou moins longues ; cependant, compte-tenu de l'histoire épidémiologique de ce virus dans le bassin méditerranéen, des conditions climatiques et écologiques, les départements limitrophes de ce bassin peuvent être considérés comme des zones particulièrement à risque de circulation virale.

Compte tenu des caractéristiques particulières de l'infection chez les équidés et les oiseaux domestiques, ces espèces sont des cibles intéressantes pour la mise en place d'un système de surveillance, dont l'objectif est essentiellement la détection la plus précoce possible de la circulation virale dans une région donnée, peut reposer sur la sensibilité du maillage vétérinaire existant (surveillance passive) ou sur la mise en place de systèmes d'alerte spécifiques visant à mettre en évidence la présence du virus (surveillance active).

1. Surveillance passive

La surveillance dans certains pays est soumise à une déclaration obligatoire des suspicions d'encéphalites équines par les vétérinaires sanitaires auprès des services concernés.

La précocité de la détection d'une éventuelle circulation du virus permettrait de mettre un dispositif de surveillance des arboviroses émergentes et ré-émergentes dans les zones à risque. Il peut s'agir d'un dispositif qui se base sur quatre maillons de la chaîne mis en œuvre en période d'activité du vecteur.

- Volet humain : Ne pas écarter une éventuelle infection au VNO lors de cas de fièvre d'origine inconnue, d'infections neuro-invasives, méningites ou méningo-encéphalites en apportant les investigations nécessaires dans les services des maladies infectieuses des établissements hospitaliers en Algérie.

- Volet équin : Une surveillance clinique des cas neuro-invasifs susceptibles d'être à WNV, de par les propriétaires et vétérinaires praticiens.

- Volet aviaire : Une surveillance de la circulation du WNV chez les oiseaux sauvages et sentinelles (principalement les corvidés afin de détecter précocement une surmortalité ceci, pour le bien des santés animale et humaine.

- Volet entomologique : Une surveillance de vecteurs en faisant un inventaire des espèces culicidiennes et une recherche du WNV sur des moustiques capturés autour des foyers équins et/ou humains , ainsi que l'établissement de mesures pour la lutte anti-vectorielle et minimiser la propagation du virus.

2. Surveillance active

- Des enquêtes sur le terrain basé sur le suivi sérologique régulier de sentinelles aviaires (oiseaux captifs, volailles domestiques ou oiseaux sauvages identifiés) ou équines doivent être menées pour connaitre la situation de l'infection.
- L'établissement, autour de chaque foyer, d'une zone de restriction des mouvements des chevaux sur un rayon défini avec une mise en quarantaine des chevaux suspects.
- La destruction des sources favorables au développement du vecteur (point d'eau stagnante) sans qu'il y ait des répercussions écologiques.

References

A.C, B. (2009). Changing patterns of West Nile virus transmission: altered vector competence and host susceptibility. *Vet. Res*, 40, 43.

Agency, E. M. (2015). EPAR product information : Equip WNV.

ANDERSON, J. T. (1999.). Isolation of West Nile virus from mosquitoes , crows and a cooêr's hawk in Connecticut. *Science, 286.*, 2331-2333.

ASSANE Gueye., M. M. (2019, Novembre 28). *West Nile Fever: A Challenge in Sahelian Africa.* Récupéré sur Springer link: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-25385-1_9

B, M. (2001). West Nile outbreak in horses in southern France 2000 the return after 35 years. *Emerg Infect Dis*, 692-6.

BAKONYI T., I. E. (2006). Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerg. Infect. Dis*, 12, 618–623.

BAKONYI, T. I. (2006). Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerg. Infect Dis*, 12, 618–623.

BECK C., a. a. (2013). Flaviviruses in Europe: complex circulation patterns and their consequences for the diagnosis and control of West Nile disease. *Int J Environ Res Public Health*, 10(11): p. 6049-83.

BECK C., J.-C. M.-G. (2013). Flaviviruses in Europe: Complex Circulation Patterns and Their Consequences for the Diagnosis and Control of West Nile Disease. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* , 10, 6049–6083.

BONDRE V.P., J. R. (2007). West Nile virus isolates from India: evidence for a distinct genetic lineage. *Gen. Virol*, 88, 875–884.

BRINTON M.A., D. J. (1988). Sequence and secondary structure analysis of the 5’-terminal region of flavivirus genome RNA. *Virology* , 162, 290–299.

Bunning, M. B. (2001.). Experimental infection of horses with West Nile virus and their potential to infect mosquitoes and serve as amplifying hosts. . *Ann NY Acad Sci 951.*, 338-339.

C.S, C. (1997-2000). West nile virus surveillance in Romania. *Viral Immunol, 2001*.

Castillo-Olivares, J. W. (2004.). West Nile virus infection of horses. . *Vet Res.*, 467-483.

CDC. (2002). Intrauterine West Nile virus infection--New York 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 51(50):1135.

CECILE, B. (2018, juin 07). *Nouvelles stratégies diagnostiques et thérapeutiques contre les flavivirus neurotropes en médecine vétérinaire.* Récupéré sur HAL archives ouvertes: https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01810046

CHANCEY C., G. A. (2015). The global ecology and epidemiology of West Nile virus. *BioMed Res. Int. 2015, 376230*.

CHARREL R.N., B. A.-J. (2003). Evolutionary relationship between Old World West Nile virus strains. *Virology*, 315, 381–388.

CHEN Y., M. T. (1997). Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target heparan sulfate. *Nat. Med*, 3, 866–871.

CHOWERS MY., L. R.-D.-I. (2000). Clinical characteristics of the West Nile fever outbreak, Israel 2000. *Emerg Infect Dis*, 7(4):675.

CHU P.W.G., W. E. (1987). Characterization of Kunjin virus RNA-dependent RNA polymerase: Reinitiation of synthesis in Vitro. *Virology*, 157, 330–337.

CICCOZZI M., P. S. (2013). Epidemiological history and phylogeography of West Nile virus lineage 2. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis*, 17, 46–50.

CIOTA A.T., K. L. (2013). Vector-Virus Interactions and Transmission Dynamics of West Nile Virus. *Viruses*, 5, 3021–3047.

CIRCOZZI M., P. S. (2013). Epidemiological history and phylogeography of West Nile virus lineage 2. Infect. Genet. Evol. *Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis*, 17, 46–50.

COLPITTS T.M., C. M. (2012). West Nile virus: biology, transmission, and human infection. *Clinical microbiology reviews*, 25: 635-648.

COLPITTS, T. M. (2012.). West Nile Virus: Biology, transmission and human infection. *Clin. Microbiol. Rev.,25*, 635-648.

CURREN EJ., L. J. (2017). West Nile virus and other nationally notifiable arboviral diseases - United States. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly 67*, 1137–1142.

DANIS K., P. A. (2011). Outbreak of West Nile Virus Infection in Greece, 2010. *Emerg. Infect. Dis*, 17, 1868–1872.

DAVOUST B., M. M.-G. (2016). Serological survey of West Nile virus in domestic animals from Northwest Senegal. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 16(5):359–61.

DEL GIUDICE P., S. I. (2004). Human West Nile virus, France. *Emerg Infect Dis*, 10(10):1885.

DIAMOND M.S., P. T. (2008). The structural immunology of antibody protection against West Nile virus. *Immunol. Rev*, 225, 212–225.

DL, H. (2008). Control of Communicable Diseases Manuel. *18th ed. Washington : American Public Health Association*.

ECDC. (2019, decembre 5). *Mise à jour épidémiologique: saison de transmission du virus du Nil occidental en Europe, 2019*. Récupéré sur Centre européen de prévention et de contrôle des maladies (ECDC): https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-west-nile-virus-transmission-season-europe-2019

FILIPE A.R., P. M. (1969). Survey for antibodies to arboviruses in serum of animals from southern Portugal. *Am J Trop Med Hyg*, 423-6.

Furnon, W. (2018). *La protéine non-structurale NS1 du virus West Nile : Etude fonctionnelle et cible potentielle de nouvelles molécules antivirales.* Récupéré sur HAL archives ouvertes: https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01775222

Furnon, W. (2018). *La protéine non-structurale NS1 du virus West Nile : étude fonctionnelle et cible potentielle de nouvelles molécules antivirales*. Récupéré sur HAL: https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01775222

FURNON, W. (2018, avril 24). *La protéine non-structurale NS1 du virus West Nile : étude fonctionnelle et cible potentielle de nouvelles molécules antivirales.* Récupéré sur HAL archives ouvertes: https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01775222

G.L, A. (2002). West Nile virus epidemic in horses, Tuscany region, Italy. *Emerg Infect Dis*, 1372-8.

GODDARD L.B., R. A. (2002). Vector competence of California mosquitoes for West Nile virus. *Emerging Infectious Diseases*, 8: 1385-1391.

GODDARD LB., R. A. (2003). Vertical transmission of West Nile virus by three California Culex (Diptera: Culicidae) species. *Med Entomol*, 40(6):743–6.

GRAY T.J., W. C. (2014). A review of the epidemiological and clinical aspects of West Nile virus. *Int. J. Gen. Med*, 7, 193–203.

Hayes E.B., G. D. (2006). West Nile virus: epidemiology and clinical features of an emerging epidemic in the United States. *Annual Review of Medicine*, 57: 181-194.

HINCKLEY AF., O. D. (2007). Transmission of West Nile virus through human breast milk seems to be rare. *Pediatrics*, 119(3):e666–71.

HUBÁLEK, Z. (2001). Comparative symptomatology of West Nile fever. *The Lancet*, 358, 254– 255.

JW, H. (1989). Prospects for treatment of viral hemorrhagic fevers with ribavirin, a broad-spectrum antiviral drug. *Rev Infect Dis*, 11(4):S750–61.

KARDJADJ M., D. A. (2019). Transboundary animal diseases in Sahelian Africa and connected regions. *Springer*, 163.

KEMENESI G., D. B. (2014). Putative novel lineage of West Nile virus in Uranotaeniaunguiculata mosquito, Hungary. *Virusdisease*, 25, 500–503.

KHAN S.A., C. P. (2017). Detection of West Nile virus in six mosquito species in synchrony with seroconversion among sentinel chickens in India. *Parasit. Vectors* , 10, 13.

KIMURA T., O. A. (1988). Association between the pH-dependent Conformational Change of West Nile Flavivirus E Protein and Virus-mediated Membrane Fusion. *J. Gen. Virol*, 69, 1247–1254.

KNIPE D.M., H. P. (2013). Fields Virology (Lippincott Williams & Wilkins).

KOMAR N., L. S. (2003). Experimental Infection of North American Birds with the New York 1999 Strain of West Nile Virus. *Emerg. Infect. Dis.*, 9, 311–322.

LECOLLINET S., e. a. (2014). La fièvre West Nile, une maladie ancienne et singulièrement actuelle en France et en Europe. *Pratique vétérinaire équine 2014. N° spécial*.

LINDSEY NP., L. J. (2015). West Nile virus and other nationally notifiable arboviral diseases-United States, 2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 64(34):929–34.

M.A, B. (2013). Replication Cycle and Molecular Biology of the West Nile Virus. *Viruses*, 6, 13–53.

Marion, R. (2017, Decembre). Estimer le risque associé aux maladies vectorielles dans un contexte d'émergence Cas de la maladie de Lyme et du virus du Nil occidental au Québec. Département de pathologie et microbiologie Faculté de médecine vétérinaire, Montreal.

MAY F.J., D. C. (2011). Phylogeography of West Nile virus: from the cradle of evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas. *J. Virol*, 85, 2964–2974.

MCLEAN B.J., H.-P. J.-M. (2015). A novel insect-specific flavivirus replicates only in Aedes-derived cells and persists at high prevalence in wild Aedes vigilax populations in Sydney, Australia. *Virology*, 486, 272–283.

MILLER DL., M. M. (2003). West Nile virus in farmed alligator. *Emerg Infect Dis*, 9(7):794.

MORREY JD., S. D. (2002). Identification of active antiviral compounds against a New York isolate of West Nile virus. *Antivir Res*, 55(1):107–16.

OLALEYE O., O. S. (1990). A survey for haemagglutination-inhibiting antibody to West Nile virus in human and animal sera in Nigeria. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 13(1):35–9.

PAPA A., D. K. (2010). Ongoing outbreak of West Nile virus infections in humans in Greece, July-August 2010. *Eurosurveillance*, 15, 34.

PAPA A., D. K. (2012). Ongoing outbreak of West Nile virus infections in humans in Greece, July-August 2010. *Euro Surveill*, 15(34).

PETERSEN L. R., B. A. (2013). West Nile Virus : review of the literature. *JAMA*, 310: 308.

PIERSON T.C., K. M. (2013). Flaviviruses: braking the entering. *Curr Opin. Virol*, 3, 3–12.

PLANIZER CB., M. J.-Y. (2009). West Nile virus infection in plasma of blood and plasma donors, United States. *Emerg Infect Dis*, 15(10):1668.

PLATONOV A.E., K. L. (2011). [Genotyping of West Nile fever virus strains circulating in southern Russia as an epidemiological investigation method: principles and results]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, 29-37.

Prevention, C. f. (s.d.). Récupéré sur https://www.cdc.gov/westnile/statsmaps/index.html

PubMed Central. (s.d.).

REISEN WK., F. Y.-Y. (2006). Overwintering of West Nile virus in Southern California. *Med Entomol*, 43(2):344–55.

RIZZOLI A., J.-C. M. (2015). The challenge of West Nile virus in Europe: knowledge gaps and research priorities. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull*, 20.

Sambri, V. C. (2013.). West Nile virus in Europe: emergence, epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention. . *Clin Microbiol and Inf 19.*, 699-704.

SCHWEITZER B.K., C. N. (2009). Overview of the Flaviviridae With an Emphasis on the Japanese Encephalitis Group Viruses. *Lab. Med*, 40, 493–499.

SIRBU A., C. C.-G. (2011). Outbreak of West Nile virus infection in humans. Romania, July to October 2010.

SMITHBURN K., H. T. (1940). A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, s1-20, 471–492.

STYER L. M., L. P. (2011). Mosquito saliva causes enhancement of West Nile virus infection in mice. *Journal of Virology*, 85: 1517-1527.

TAYLOR R.M., W. T. (1956). A Study of the Ecology of West Nile Virus in Egypt1. Am. *J. Trop. Med. Hyg*, 5, 579–620.

VALIAKOS G., T. A. (2011). Molecular detection and phylogenetic analysis of West Nile virus lineage 2 in sedentary wild birds (Eurasian magpie), Greece, 2010. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur.Commun. Dis. Bull*, 16.

VAN DER MEULEN KM., P. M. (2005). West Nile virus in the vertebrate world. *Arch Virol*, 150(4):637–57.

VAZQUEZ A., S.-S. M. (2010). Putative new lineage of west nile virus, Spain. *Emerg Infect. Dis*, 16, 549–552.

VENTER M., S. R. (2010). West Nile virus lineage 2 as a cause of zoonotic neurological disease in humans and horses in southern Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt. N 10*, 659–664.

WEINGARTL H.M., D. M.-B. (2003). Comparison of assays for the detection of West Nile virus antibodies in chicken serum. *Can. J. Vet. Res*, 67, 128–132.

ZHOU Y., R. D.-Y. (2007). Structure and Function of Flavivirus NS5 Methyltransferase. *J. Virol*, 81, 3891–3903.