



**HAL**  
open science

# Oiseaux sauvages et virus West Nile : étude éco-épidémiologique en Camargue

Elsa Jourdain

► **To cite this version:**

Elsa Jourdain. Oiseaux sauvages et virus West Nile : étude éco-épidémiologique en Camargue. Ecologie, Environnement. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT : . tel-00144110

**HAL Id: tel-00144110**

**<https://theses.hal.science/tel-00144110v1>**

Submitted on 30 Apr 2007

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Thèse

**Présentée devant l'Université Joseph Fourier – Grenoble 1**

Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement  
Spécialité : Méthodes de Recherche sur l'Environnement et la Santé

**pour l'obtention du  
DIPLOME DE DOCTORAT**

**par**

**Elsa JOURDAIN**

## **Oiseaux sauvages et virus West Nile : étude éco-épidémiologique en Camargue**

Date de la soutenance : 14 décembre 2006

***Composition du jury :***

Messieurs	Thierry Boulinier	<i>Rapporteur</i>
	Emmanuel Drouet	<i>Président</i>
	Michel Gauthier-Clerc	
	Björn Olsen	<i>Rapporteur</i>
	Philippe Sabatier	
	Hervé Zeller	

EPSP– TIMC, UMR 55-25, ENVL-INRA, 1 avenue Bourgelat, F-69280 Marcy l'Etoile

Station Biologique de la Tour du Valat, Le Sambuc, F-13200 Arles

CNR des Arbovirus et Fièvres Hémorragiques, Institut Pasteur, 21 avenue Tony Garnier, F-69365 Lyon cedex 7



*« Un micro-organisme, quel qu'il soit, ne vit que par les relations qu'il entretient avec son environnement immédiat, en particulier l'organisme de l'hôte qui l'héberge et, pour certains d'entre eux, l'organisme du vecteur qui le transmet. Ensemble, le micro-organisme, l'hôte et le vecteur constituent un système biologique complexe qui fonctionne dans un écosystème donné et qui doit être abordé comme un tout indissociable. De plus, ces systèmes biologiques sont en perpétuelle évolution par ajustements permanents en réponse aux modifications de l'environnement. Des équilibres se créent, d'autres disparaissent.*

*Le travail de l'épidémiologiste consiste à disséquer les systèmes en question pour en comprendre le fonctionnement. Cela signifie que le problème doit être abordé comme un naturaliste aborde une question de biologie évolutive. Si nous voulons réellement comprendre comment fonctionne un système épidémiologique, nous devons considérer en même temps tous les éléments de ce système, et mettre à jour ce réseau si complexe de relations d'interdépendance qu'à travers le temps ils ont pu nouer entre eux. »*

**F. Rodhain** (Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, 1998)



# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury :

Philippe Sabatier, qui m'a proposé ce sujet de thèse et m'a fait confiance bien que je ne sois pas une modélisatrice en herbe. Je le remercie pour son soutien et sa disponibilité.

Michel Gauthier-Clerc, grâce à qui j'ai découvert la Station biologique de la Tour du Valat et la Camargue, ce paradis des oiseaux. Merci pour ses conseils et sa confiance.

Hervé Zeller, qui m'a très gentiment accueillie au sein du CNR des Arbovirus et Fièvres hémorragiques et m'a permis de m'initier aux techniques de sérologie, biologie moléculaire et virologie.

Thierry Boulinier, qui a accepté d'évaluer ce travail même si mon approche est plus celle d'un épidémiologiste que d'un écologiste des interactions hôtes-parasites.

I sincerely thank Björn Olsen for the honour he made me in accepting to evaluate this work.

Merci également à Emmanuel Drouet qui a accepté de participer à mon jury de thèse et d'y représenter l'EDISCE.

Je remercie toutes les personnes qui m'ont aidée au cours de ces trois années de travail, par leurs conseils, leur aide, ou tout simplement leur bonne humeur...

A l'Ecole Vétérinaire de Lyon,

Merci aux membres de l'équipe EPSP : Dominique (toujours disponible et encourageant), Agnès (merci de ton aide pour les écuries), Karine (avec qui j'ai partagé les joies de la course finale à la thèse/HDR), Marc (le « vous » persistera-t-il après une deuxième thèse ?) ; un grand merci à Martine et Fereshteh, toujours là quand on a besoin d'elles ; merci enfin aux étudiants de la « salle des stagiaires » : Jennifer, Delphine, Antoinette, Papa Ibrahim, et tous les autres... Un clin d'œil spécial pour Thomas qui a réussi à me sensibiliser à la beauté des moustiques et à faire en sorte que j'essaie de savoir qui ils sont avant de les écraser ; merci pour les heures passées à discuter ensemble de ce fameux virus West Nile. Un énorme merci à Audrey qui a saupoudré de bonne humeur ma troisième année de thèse ! Merci également à Christine Farmer toujours disponible, efficace et souriante.

A la Station biologique de la Tour du Valat,

Je remercie Luc Hoffmann, fondateur de la Station, de m'avoir accueillie sur le domaine. Merci à Yves de m'avoir appris à baguer et d'avoir initié mon oreille aux chants des oiseaux : je continue, tout doucement, à progresser... Un grand merci à Olivier pour son accueil toujours chaleureux et pour m'avoir fait découvrir le domaine en voiture, en barque, à pied et à cheval. Je remercie mon grand ami Antoine, spécialiste mondial du lâcher de moineaux friquets, pour son aide sur le terrain et pour m'avoir emmenée avec lui rendre visite aux bébés flamants. Merci à Marco, Loïc, Alain et Gaétan pour leur disponibilité ; à Damien qui m'a toujours logée en première classe ; à Mireille et Marie-Antoinette qui ont répondu patiemment à tous mes appels téléphoniques. Merci également à Jaqueline de m'avoir fait parvenir la bibliographie que je ne trouvais nulle part ailleurs. Merci enfin à tous les stagiaires et salariés qui ont animé les repas et les soirées... Une pensée particulière pour Jacinthe, Charlotte, Sandrine, Julie, mais aussi Cécile, Romain, Séb, Patrice, Céline, Paula, Claire, le p'tit Louis, Manuel, Camille, Özge, Anila et tant d'autres ! Un grand merci à vous qui m'avez aidée à capturer les pies en 2005 : Océane, Claire, Stéphanie et Alexandre. Merci enfin à Yann d'avoir préféré l'anapath et de m'avoir laissé le champ libre sur West Nile...

A l'Institut Pasteur,

Je remercie toute l'équipe pour son accueil. Un énorme merci à Séverine, Steph, Caro et Nadège, qui m'ont pris sous leur aile et ont eu la patience de m'initier au travail de laboratoire. Merci beaucoup à Jehanara de m'avoir orientée sur mon chemin de thésarde et de m'avoir aidée, ainsi qu'Isabelle, à réaliser le travail de phylogénie. Merci à Valérie pour sa bonne humeur et pour avoir osé faire le coup du chapeau ! Merci à Olivier pour nos discussions sur les oiseaux dans ce monde de laboratoire. Je remercie également Christophe Bertauld et toutes les personnes du PCS qui ont attendu que je sorte du P3 les vendredi soirs...

Je remercie aussi toutes les personnes qui m'ont aidée hors du cadre de cette trilogie de laboratoires d'accueil, en particulier :

Ursula Höfle, Jean Hars et Ted Leighton qui ont pris le temps de discuter avec moi de mon sujet de thèse et ont su me conseiller.

Paul Reiter qui m'a permis de participer à une réunion du projet EDEN et d'y rencontrer des chercheurs travaillant sur le virus West Nile en Europe.

Les éleveurs de chevaux et les piégeurs qui ont accepté que des comptages ou des captures d'oiseaux soient effectués sur leur propriété.

Les Marais du Vigueirat, le Centre Scamandre et le Parc de Pont de Gau, qui ont autorisé la capture et le baguage d'oiseaux sur leur terrain et m'ont toujours montré un accueil chaleureux.

Le Dr. vétérinaire Weingarten qui a accepté de prélever des oiseaux pour me permettre de disposer de témoins pour les analyses de laboratoire.

José Francisco Ruiz Fons qui m'a fourni une clé d'identification pour les tiques ; Gwenaël Vourch et M. Dang qui se sont penchés sur quelques unes de mes tiques pour confirmer mon diagnostic ; et Jan Chirico qui a eu la gentillesse de regarder mes photos de mallophages.

Le comité de relecture... Merci les filles !

Le frangin, qui m'a très gentiment aidée pour le travail de terrain (si si, c'est du travail !)

Je remercie l'INRA et le CNES qui ont financé mon travail, ainsi que la région PACA.

Merci à mes parents, aux Chartreux et au frangin pour votre soutien. Merci à tous ceux auprès de qui j'ai passé de bons moments pendant ces trois années pleines de péripéties...

# Sommaire

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE 1.</b>	<b>7</b>
<b>CONDITIONS ECOLOGIQUES NECESSAIRES A LA CIRCULATION DU VIRUS WEST NILE</b>	
<b>1 Amplification mettant en jeu des oiseaux et des moustiques ornithophiles</b>	<b>10</b>
1.1 Des moustiques compétents	10
1.2 Des oiseaux compétents	10
1.3 Des interactions entre oiseaux et moustiques compétents	13
<b>2 Autres voies d'amplification</b>	<b>16</b>
2.1 Transmission non vectorielle	16
2.2 Transmission vectorielle non virémique	17
2.3 Hôtes amplificateurs autres que les oiseaux	18
2.4 Transmission par des vecteurs autres que les moustiques	18
<b>CHAPITRE 2.</b>	<b>21</b>
<b>REPARTITION SPATIO-TEMPORELLE DES OISEAUX SAUVAGES DE CAMARGUE ET ESPECES CANDIDATES A LA CIRCULATION DU VIRUS WEST NILE</b>	
<b>1. Principe et objectifs</b>	<b>23</b>
<b>2. Matériel et méthodes</b>	<b>23</b>
2.1 Données sur les mouvements migratoires	23
2.1.1 Reprises de bagues	23
2.1.2 Télémétrie satellitaire	24
2.2 Indices d'abondance et de diversité	25
2.2.1 A l'échelle de la Camargue	26
2.2.2 Aux environs des écuries	26
<b>3. Résultats et discussions</b>	<b>27</b>
3.1 Périodes à risque pour l'introduction de pathogènes en Camargue	27
<i>Article 1</i>	
3.2 Oiseaux candidats à l'introduction, l'amplification et la dispersion du virus West Nile en Camargue	27
<i>Article 2</i>	



3.3 Comptages autour des écuries et oiseaux candidats à l'émergence du virus West Nile en Camargue	28
3.4 Suivi satellitaire de jeunes hérons pourprés	29
<b>CHAPITRE 3.</b>	<b>33</b>
<b>SEROPREVALENCE, ISOLEMENT ET PHYLOGENIE DU VIRUS WEST NILE CHEZ LES OISEAUX SAUVAGES DE CAMARGUE</b>	
<b>1. Principe et objectifs</b>	<b>35</b>
<b>2. Matériel et méthodes</b>	<b>35</b>
2.1 Protocole d'enquête	36
2.1.1 Oiseaux migrants potentiellement introducteurs	36
2.1.2 Oiseaux nicheurs coloniaux potentiellement amplificateurs	38
2.1.3 Oiseaux sédentaires potentiellement impliqués dans l'émergence	39
2.2 Méthodes d'analyse au laboratoire	42
2.2.1 Sérologie	42
2.2.2 Biologie moléculaire et virologie	52
<b>3. Résultats et discussions</b>	<b>54</b>
3.1 Séroprévalence chez les oiseaux migrants en provenance d'Afrique sub-saharienne	54
<i>Article 3</i>	
3.2 Séroprévalence chez les poussins d'une espèce coloniale, le Héron garde-bœufs	55
3.3 Séroprévalence et isolement viral chez les oiseaux sédentaires en période épizootique, phylogénie sur génome complet	56
<i>Article 4</i>	
3.4 Séroprévalence et excrétion du virus chez les oiseaux sédentaires en période post-épizootique	57
<b>CHAPITRE 4.</b>	<b>63</b>
<b>DISCUSSION GENERALE</b>	
<b>1. Discussion sur les oiseaux sauvages de Camargue et le virus West Nile en période épizootique (année 2004) et post-épizootique (année 2005)</b>	<b>65</b>
<b>2. Discussion sur les méthodes utilisées</b>	<b>67</b>
2.1 Méthodes d'étude des oiseaux sauvages	67
2.1.1 Description de la population	67
2.1.2 Analyse des mouvements migratoires	68

2.2 Méthodes de laboratoire	68
2.2.1 <i>Choix des techniques sérologiques</i>	68
2.2.2 <i>Qualité des tests sérologiques</i>	70
2.2.3 <i>Cinétique des anticorps</i>	71
2.2.4 <i>Techniques directes</i>	72
<b>3. Synthèse des connaissances sur les oiseaux sauvages de Camargue et le virus West Nile</b>	<b>73</b>
3.1 Rôle dans l'introduction	73
3.2 Rôle dans l'amplification	75
3.3 Rôle dans l'émergence	77
3.4 Rôle dans la dissémination	78
3.5 Rôle de réservoir	79
3.6 Rôle de sentinelle	81
3.7 Rôle d'hôte sensible	83
<b>4. Conclusion et perspectives</b>	<b>85</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>87</b>
<b>NOM SCIENTIFIQUE DES OISEAUX CITES DANS LE TEXTE</b>	<b>107</b>
<b>ARTICLES</b>	<b>111</b>
Article 1 : <i>Bird migration routes and pathogen dispersion risk into western Mediterranean wetlands</i>	113
Article 2 : <i>Bird species potentially involved in introduction, amplification and spread of West Nile virus in a Mediterranean wetland, the Camargue (southern France)</i>	135
Article 3 : <i>West Nile virus serosurvey on wild birds migrating from sub-Saharan Africa into Western Europe</i>	163
Article 4: <i>West Nile virus in wild resident birds, southern France, 2004</i>	181
<b>ANNEXES</b>	<b>191</b>



---

# ***INTRODUCTION***

---



Le monde médical et vétérinaire fait preuve aujourd'hui d'un regain d'intérêt pour les maladies associées aux **animaux sauvages** (Daszak *et al.* 2000, Moutou 2000, Artois *et al.* 2003, Anonyme 2004). Les espèces sauvages sont en effet amenées à être en contact avec l'Homme et les animaux domestiques, en raison d'une profonde modification des relations entre sociétés humaines et écosystèmes naturels (dégradation des milieux naturels, nourrissage des espèces sauvages, modification des pratiques culturelles, explosion démographique, mondialisation des échanges). Elles représentent une source de pathogènes pouvant conduire à l'émergence ou la ré-émergence de maladies infectieuses problématiques en santé humaine ou animale (Morse 1995, Chomel 1998, Mahy & Brown 2000, Cleaveland *et al.* 2001, Dobson & Foufopoulos 2001, Taylor *et al.* 2001, Rodhain 2003, McMichael 2004, Karesh *et al.* 2005). Les **oiseaux sauvages** sont porteurs de nombreux parasites *sensu lato* (virus, bactéries, champignons, macroparasites) dont certains sont des pathogènes potentiellement transmissibles à l'Homme (zoonoses) ou aux animaux domestiques (Janovy 1997, Moutou 1997, Nuttal 1997, Friend *et al.* 2001). Les oiseaux ont de plus la particularité de pouvoir se déplacer rapidement sur de grandes distances. En quelques semaines, des milliards d'oiseaux transitent chaque année d'un continent à l'autre pour rejoindre, selon la saison, leur site d'hivernage ou de nidification (Alerstam 1990). Au cours de ces déplacements, ils véhiculent avec eux tout un panel de pathogènes susceptibles de conduire à l'émergence de maladies dans des zones jusqu'alors indemnes (Moutou 2001, Walendström *et al.* 2002, Hubalek 2004, Comstedt *et al.* 2006, Olsen *et al.* 2006).

L'étude du rôle des oiseaux sauvages dans les cycles épidémiologiques, en tant qu'hôtes principaux ou secondaires, nécessite de comprendre les relations qu'ils entretiennent avec les autres organismes (hôtes et pathogènes) et leur environnement. Cette approche se place donc à la frontière entre l'**épidémiologie**, qui est l'étude des maladies et des facteurs de santé dans une population (Toma *et al.* 2001), et l'**écologie**, qui est l'étude des interactions d'une part entre différents organismes et d'autre part entre les organismes et leur environnement (Poulin 1998). La prise en compte des aspects écologiques est particulièrement importante pour des agents infectieux dont le cycle de transmission implique plusieurs espèces de vertébrés ou d'invertébrés. C'est le cas par exemple des **arbovirus**, appellation qui regroupe tout un ensemble de virus très différents sur le plan taxonomique mais ayant en commun leur mode habituel de transmission par l'intermédiaire d'un arthropode vecteur. Ces virus ont la capacité de se multiplier dans deux milieux très différents que sont, d'une part, les cellules d'un arthropode à température ambiante et, d'autre part, les cellules d'un vertébré en général homéotherme (Rodhain 1998). Pour certains arbovirus, appartenant essentiellement aux genres *Alphavirus* et *Flavivirus*, les oiseaux sauvages jouent un rôle majeur dans le cycle de transmission (Stamm 1966, Simpson 1993, Eldridge *et al.* 2000). Ces virus sont le résultat d'une co-évolution, c'est-à-dire d'adaptations réciproques successives, entre virus, oiseaux et moustiques vecteurs (Rodhain & Perez 1985).

Le modèle choisi pour notre étude est celui du virus **West Nile (WN)**, un arbovirus de la famille des Flaviviridae et du genre *Flavivirus*. Isolé pour la première fois en Ouganda en 1937, le virus WN est un virus de l'Ancien Monde, largement distribué en Afrique et en Eurasie (Hubalek & Halouzka 1999, Murgue *et al.* 2002). Il se manifeste sous la forme de foyers épizootiques ou épidémiques limités et provoque chez l'Homme et le Cheval un syndrome fébrile pouvant se compliquer de troubles neurologiques graves. En 1999, le virus WN est soudainement apparu sur le continent américain, aux environs de New York (Anderson *et al.* 1999, CDC 1999). Les modalités de son introduction sont inconnues mais l'hypothèse d'une origine anthropique, par exemple par importation d'oiseaux exotiques infectés, semble la plus plausible (Rappole & Hubalek 2003). Depuis, le virus s'est propagé progressivement au nord jusqu'au Canada (ASPC 2006), à l'ouest jusqu'à l'Océan Pacifique (CDC 2006) et au sud, atteignant le Mexique (Deardorff *et al.* 2006), les Antilles (Quirin *et al.* 2004), la République dominicaine (Komar *et al.* 2003b) et même l'Argentine (Morales *et al.* 2006). Alors que dans l'Ancien Monde le virus WN n'était qu'exceptionnellement associé à une mortalité chez les oiseaux sauvages, il provoque sur le continent américain une mortalité élevée chez certaines espèces d'oiseaux, en particulier de la famille des Corvidés (Bernard *et al.* 2001, Mostashari *et al.* 2003, Peterson *et al.* 2004).

**En France**, tout comme dans le reste de l'Europe (Hubalek & Halouzka 1999) et du bassin méditerranéen (Murgue *et al.* 2001a), le virus WN est considéré comme ré-émergent (Murgue *et al.* 2001b). Sa première description remonte aux années soixante, en **Camargue (Figure 1)**. Des troubles neurologiques ont été observés sur une cinquantaine de chevaux et plusieurs cas humains d'encéphalite ont été rapportés la fin de l'**été 1962** (Hannoun *et al.* 1965). L'étiologie de l'infection a tout d'abord été révélée par la mise en évidence d'anticorps spécifiques des flavivirus (Hannoun *et al.* 1965) puis trois isolats ont été effectués : en 1964, à partir d'un moustique *Culex modestus* d'une part et du sang de deux patients souffrant de fièvre d'autre part (Hannoun *et al.* 1964) ; en 1965, à partir de la moelle épinière d'un jeune cheval euthanasié (Panthier *et al.* 1966). Après 1967, aucun cas clinique d'infection par le virus WN n'a été rapporté, mais une enquête sérologique sur patients humains et chevaux entre 1975 et 1976 a révélé une faible prévalence vis-à-vis du virus WN (Rollin *et al.* 1982). En revanche, tous les oiseaux (Goéland leucopnée *Larus cachinnans*, Mouette rieuse *Larus ridibundus*, Flamant rose *Phoenicopterus roseus* et Choucas des tours *Corvus monedula*) testés en sérologie (n=80) étaient négatifs (Rollin *et al.* 1982). Deux autres enquêtes sérologiques effectuées dans les années quatre-vingt laissent penser que le virus WN a continué à circuler à bas bruit (Raoult *et al.* 1985, Le Lay-Rogues *et al.* 1990). Toutefois, aucun nouveau diagnostic clinique n'a été rapporté jusqu'à l'année 2000 (Murgue *et al.* 2001b).

A la fin de l'**été 2000**, 76 cas cliniques ont été diagnostiqués sur des chevaux de Camargue et le virus WN a pu être isolé à partir du cerveau de l'un des premiers cas. Une

enquête sérologique sur l'avifaune locale, mise en place en septembre 2000, a permis de montrer la présence d'anticorps spécifiques du virus WN chez le Goéland leucophée et la Pie bavarde *Pica pica* ainsi que chez des canards colvert *Anas platyrhynchos* utilisés comme appelants par des chasseurs (Hars *et al.* 2004). En 2001 et 2002, la circulation du virus WN a été révélée grâce à la séroconversion d'oiseaux sentinelles (Hars *et al.* 2004) et de chevaux (Bicout *et al.* 2003), mais aucun cas clinique n'a été rapporté. Enfin, en 2003, aucun des oiseaux sentinelles de Camargue n'a présenté de séroconversion (Hars *et al.* 2005a). En revanche, des cas cliniques chez l'Homme et le Cheval sont apparus à la fin de l'été 2003 dans le Var, soit 150 kilomètres à l'est de la Camargue (Del Giudice *et al.* 2004).

A la fin de l'année 2003, les connaissances relatives au rôle des différents oiseaux de Camargue dans la circulation du virus WN étaient donc très limitées. Notre travail est destiné à faire le point sur ces différentes interactions avec pour **objectifs** : (1) d'identifier des « espèces candidates » susceptibles d'intervenir dans la circulation du virus WN en Camargue ; (2) de décrire la situation épidémiologique vis-à-vis du virus WN pour quelques une de ces espèces candidates. Pour atteindre ces objectifs, nous avons tenté de répondre aux questions suivantes :

- Quelles sont les conditions écologiques nécessaires et les interactions mises en jeu dans le cycle épidémiologique du virus WN ? (*chapitre 1*)
- Quelles sont les espèces d'oiseaux sauvages qui interviennent dans la circulation du virus WN en Camargue ? (*chapitre 2*)
- Quelle est la prévalence du virus WN dans la population d'oiseaux sauvages de Camargue ? (*chapitre 3*)

Le *chapitre 4* résume la situation épidémiologique observée en Camargue en 2004-2005, souligne les difficultés associées aux investigations sur les maladies de la faune sauvage, dresse une synthèse des connaissances actuelles sur le rôle des oiseaux sauvages dans la circulation du virus West Nile en Camargue et suggère de nouvelles perspectives de recherche.



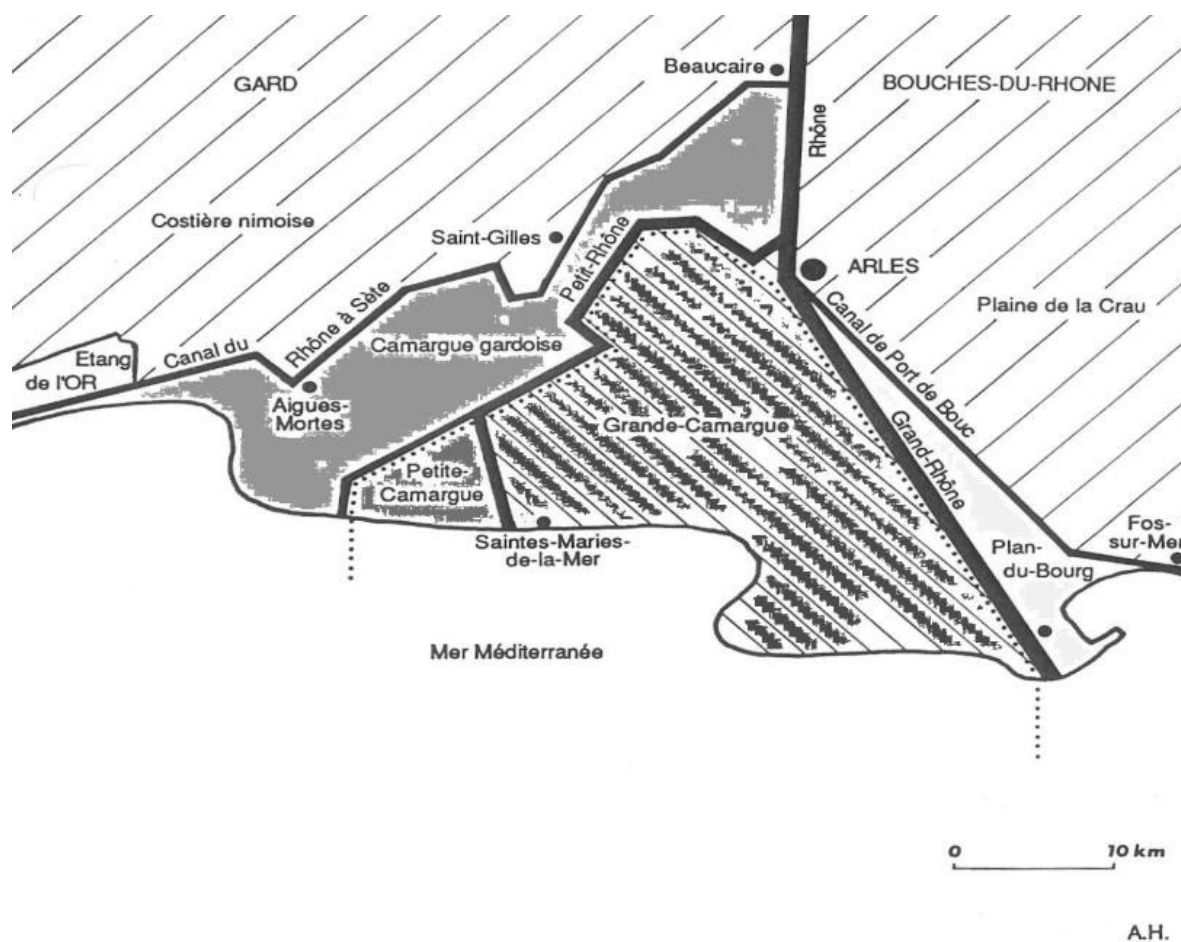


Figure 1 : La zone d'étude désignée par la dénomination « Camargue ».

---

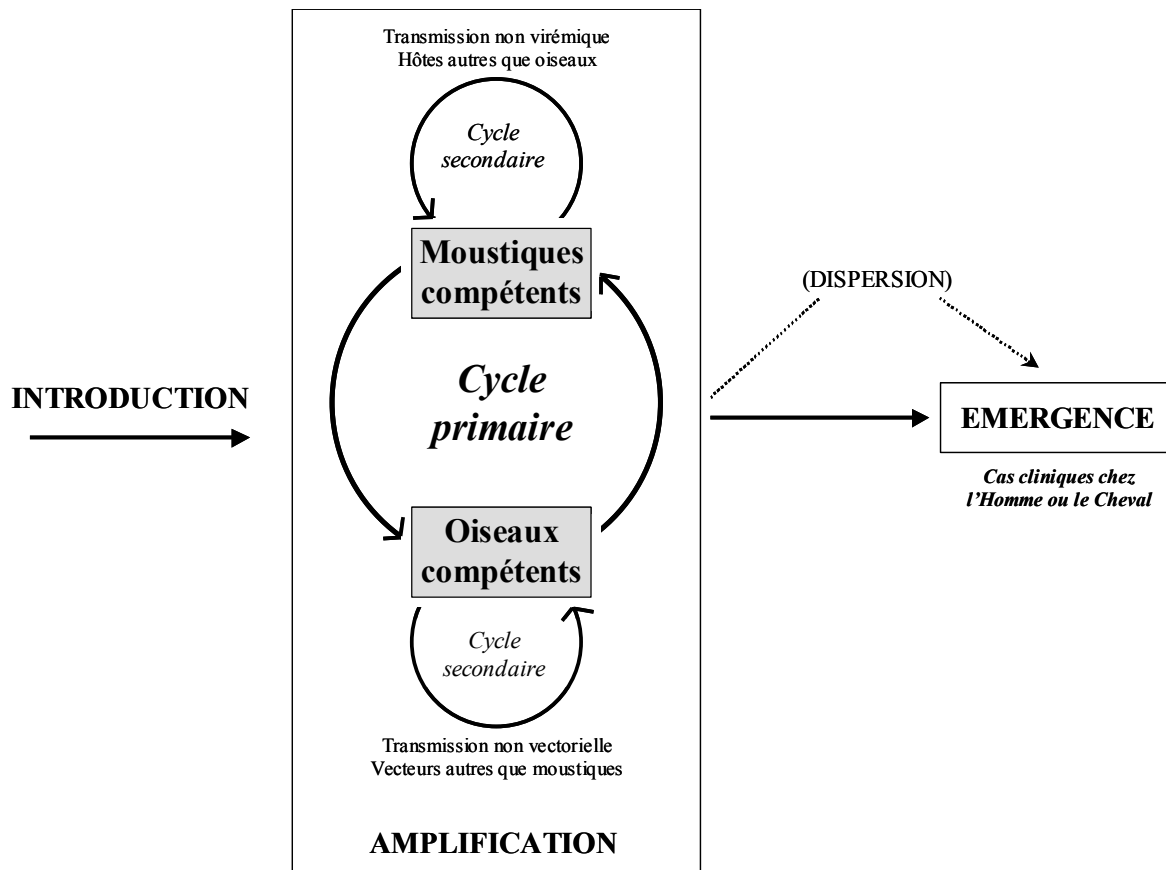
# ***CHAPITRE 1***

---

## ***Conditions écologiques nécessaires à la circulation du virus West Nile***



C'est souvent l'apparition de cas cliniques chez les hôtes sensibles (hommes et/ou chevaux) qui révèle la présence du virus WN dans une région. Cette **phase d'émergence** soulève différentes questions. D'où le virus vient-il ? Comment est-il arrivé ? Depuis quand est-il là ? Comme pour de nombreux autres arbovirus (Lord & Calisher 1970, Hubalek 2004), il est considéré que le virus WN est véhiculé par les oiseaux, durant les migrations, à partir de régions où il circule de façon endémique ou épidémique (Zeller & Murgue 2001, Malkinson & Banet 2002). Cette **phase d'introduction** est nécessaire si le virus n'était pas présent auparavant dans la zone considérée, mais n'est pas suffisante pour expliquer l'apparition concomitante de cas chez les espèces sensibles. Une **phase d'amplification** doit exister au préalable de la phase d'émergence (*figure 2*). Cette seconde phase repose sur un cycle primaire de transmission mettant principalement en jeu des oiseaux et des moustiques ornithophiles. Elle est essentielle puisqu'elle va permettre une augmentation progressive du niveau de circulation virale (c'est-à-dire une augmentation du nombre de vecteurs et d'hôtes infectés). Sa compréhension est complexe car elle dépend de nombreux facteurs.



**Figure 2** : Les phases d'introduction, d'amplification puis d'émergence du virus West Nile.

Nous allons exposer dans ce chapitre les conditions nécessaires à l'existence d'un foyer d'amplification. Dans un premier temps, nous décrirons les critères qui permettent la mise en place d'un cycle de transmission entre oiseaux et moustiques ornithophiles (cycle primaire d'amplification). Puis nous aborderons d'autres voies d'amplification possibles pour le virus.

# 1 Amplification mettant en jeu des oiseaux et des moustiques ornithophiles

Le cycle primaire d'amplification implique une succession d'évènements, d'une part pour que les hôtes s'infectent à partir des moustiques et, d'autre part, pour que les moustiques s'infectent à partir des hôtes. La réalisation de ces différentes étapes dépend de facteurs associés aux vecteurs (moustiques), aux hôtes (oiseaux) et aux diverses interactions entre les hôtes et les vecteurs.

## 1.1 Des moustiques compétents

La **compétence vectorielle** est l'aptitude d'un arthropode à être infecté par un pathogène, à assurer son développement et à le transmettre efficacement à un nouvel hôte sensible (Rodhain & Perez 1985, Weaver *et al.* 2004). Elle est évaluée en laboratoire. Elle varie en fonction de divers facteurs, intrinsèques et extrinsèques, comme par exemple la température (Rodhain 1989, Dohm *et al.* 2002).

Se référer à Balenghien (2006) pour une élégante synthèse sur la compétence vectorielle des moustiques vis-à-vis du virus WN.

## 1.2 Des oiseaux compétents

Par analogie avec les vecteurs, la notion de **compétence d'hôte** a été suggérée. Selon les auteurs, elle est appelée *host competence* (Reisen *et al.* 2003b, Komar *et al.* 2005a, Reisen *et al.* 2005a, Kilpatrick *et al.* 2006a) ou *reservoir competence* (Komar *et al.* 1999, Ostfeld & Keesing 2000, Schmidt & Ostfeld 2000, Komar *et al.* 2003a). Elle correspond à la « capacité d'une espèce hôte à être infectée et à présenter l'agent infectieux à des vecteurs » (Komar *et al.* 1999). Tout comme la compétence vectorielle, la compétence d'hôte est évaluée au laboratoire : des vecteurs indemnes de l'infection sont nourris sur des hôtes préalablement infectés, soit artificiellement (par injection), soit naturellement (par un vecteur), et le pourcentage de vecteurs infectés est ensuite évalué (Ostfeld & Keesing 2000).

Un **index de compétence**  $C_i$ , indiquant le nombre de vecteurs infectants obtenus à partir d'un oiseau d'une espèce donnée, a été proposé (Komar *et al.* 1999, Komar *et al.* 2003a). Il est calculé de la façon suivante :

$$C_i = s * i * d \text{ avec}$$

- $s$  : sensibilité (proportion d'oiseaux de cette espèce qui, chaque jour, deviennent infectés après piquûre par des vecteurs infectés),
- $i$  : infectivité journalière moyenne (proportion de vecteurs exposés qui, chaque jour, deviennent infectants après repas sanguin sur un oiseau infecté de l'espèce considérée),

- ***d*** : durée d'infectivité (nombre de jours pendant lesquels un oiseau infecté de cette espèce présente une virémie infectieuse).

En théorie, les paramètres ***s***, ***i*** et ***d*** sont estimés expérimentalement pour chaque espèce d'oiseau et de moustique sur un échantillon suffisamment grand.

Pour le virus WN, des valeurs d'index de compétence ont été suggérées pour 25 espèces d'oiseaux infectées expérimentalement avec la souche NY99 (Komar *et al.* 2003a). 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 (Turell *et al.* 2000) et en considérant que seule une virémie supérieure ou égale à  $10^5$  PFU/mL est infectieuse. Or, l'hypothèse selon laquelle les oiseaux qui ont une virémie inférieure à un certain seuil sont incapables de contaminer la population de vecteurs est fautive et risque de conduire à la sous-estimation du rôle joué par certaines espèces d'oiseaux (Marra *et al.* 2004, Lord *et al.* 2006). En effet, sous cette hypothèse, tous les oiseaux qui ont une virémie inférieure à  $10^5$  PFU/mL deviennent des culs-de-sac épidémiologiques. Pour Lord *et al.* (2006), le raisonnement correct est en fait un raisonnement probabiliste : quelle que soit la virémie, il existe une probabilité pour que le vecteur s'infecte. Cette probabilité peut tendre vers zéro pour les virémies faibles et vers un pour les virémies fortes, mais la notion de seuil n'a pas de sens. Ainsi, en terme de probabilité, beaucoup de repas sanguins ne contiendront pas de virions en dessous d'une virémie de  $10^3$  PFU/mL (Lord *et al.* 2006). Les index de compétence actuellement utilisés pour évaluer la participation de différentes espèces d'oiseaux à l'amplification du virus WN aux Etats-Unis (Komar *et al.* 2003a, Kilpatrick *et al.* 2006a) devraient donc être réévalués en se basant sur des courbes expérimentales d'infectivité.

La durée d'infectivité ***d***, pendant laquelle un oiseau présente une virémie (nous abandonnons la notion de virémie *infectieuse*), est importante à prendre en compte, en particulier pour les oiseaux qui présentent une virémie élevée. En effet, les infections expérimentales sur différentes espèces d'oiseaux montrent que la charge virale observée est souvent maximale peu avant la mort des individus (Work *et al.* 1955, Komar *et al.* 2000, Brault *et al.* 2004, Komar *et al.* 2005a, Langevin *et al.* 2005, Reisen *et al.* 2005a). Les oiseaux présentant un pic de virémie juste en dessous du niveau létal pourraient donc infecter un plus grand nombre de moustiques que les espèces qui présentent une virémie élevée associée à une forte mortalité (Lord *et al.* 2006).

Cette notion de niveau de létalité est toutefois relative car la réponse d'un oiseau à l'infection par le virus WN (létalité, intensité et durée de la virémie) est influencée par de nombreux facteurs extrinsèques (génétique, âge, état physiologique, statut immunitaire, contact préalable avec le virus) et intrinsèques (souche virale) dont les interactions sont mal

connues (Scott & Edman 1991, Ostfeld & Keesing 2000, van der Meulen *et al.* 2005). Par exemple, on constate de très grandes différences de sensibilité pour les oiseaux d'une même espèce en fonction de leur âge. Ainsi, alors que les poulets de plus de trois semaines présentent une virémie faible (de l'ordre de  $10^3$  PFU/mL), les poussins âgés de 1 à 11 jours sont quant à eux sensibles à l'infection et développent une virémie suffisante pour infecter des moustiques vecteurs (Taylor *et al.* 1956, Guy & Malkinson 2003, van der Meulen *et al.* 2005). De même, chez les oies, les jeunes individus peuvent s'avérer sensibles au virus alors que ceux de plus de 12 semaines survivent à l'infection (Guy & Malkinson 2003, Austin *et al.* 2004). Ces observations sont peu surprenantes puisque le système immunitaire des oiseaux n'est pas complètement développé à la naissance (Ritchie 1995) mais montrent bien qu'il est nécessaire de tenir compte de la variabilité de la population pour évaluer le risque d'amplification du virus WN par une espèce donnée. En outre, la transmission d'anticorps maternels a été démontrée chez les oiseaux pour de nombreux arbovirus (Kissling *et al.* 1954, Reeves *et al.* 1954, Sooter *et al.* 1954, Buescher *et al.* 1959, Bond *et al.* 1965, Holden *et al.* 1973, Ludwig *et al.* 1986), y compris pour le virus WN (Berezin 1971, Jamgaonkar *et al.* 2003, Gibbs *et al.* 2005, Reisen *et al.* 2005b, Stout *et al.* 2005, Hahn *et al.* 2006). Or, la transmission d'immunoglobulines maternelles aux poussins peut modifier leur sensibilité aux infections (Ludwig *et al.* 1986, Gasparini *et al.* 2002, Grindstaff *et al.* 2003, Guy & Malkinson 2003).

**En résumé**, la compétence d'hôte nécessite d'importantes investigations de laboratoire pour être évaluée de façon quantitative et ces investigations doivent être entièrement renouvelées d'une espèce d'oiseau à l'autre (à moins qu'il ne soit mis expérimentalement en évidence que le nombre de moustiques infectés pour une virémie donnée est le même d'une espèce d'oiseau à une autre, mais cette information n'est pas disponible pour le moment). De façon très schématique, on peut toutefois considérer qu'une espèce d'oiseau présentant une virémie forte et durable associée à une faible mortalité possède *a priori* une compétence d'hôte élevée. En revanche, une espèce présentant une forte virémie associée à une forte mortalité n'est peut-être pas plus compétente qu'une espèce présentant une virémie modérée et aucune mortalité. Par ailleurs, la compétence d'hôte est difficile à extrapoler car elle peut varier entre individus d'une même espèce en fonction de divers facteurs. Les valeurs d'index de compétence estimées pour une espèce d'oiseau donnée, un vecteur donné, une souche virale donnée, ne sont applicables en théorie que si l'on s'intéresse à un système comprenant cette même souche virale, ce même vecteur et uniquement des oiseaux adultes de cette espèce, en bonne santé et naïfs vis-à-vis du virus WN. Cette situation n'étant jamais observée en conditions naturelles, il faut garder en mémoire les hypothèses sous-jacentes à la notion de compétence d'hôte quand celle-ci est utilisée dans des modèles prédictifs.

## **1.3 Des interactions entre oiseaux et moustiques compétents**

Pour qu'un cycle d'amplification s'installe, il est nécessaire que vecteurs et hôtes, compétents en laboratoire, se rencontrent effectivement et régulièrement en conditions naturelles. La probabilité de ces contacts dépend de plusieurs facteurs tels que : les préférences écologiques et le cycle d'activité des hôtes et des vecteurs ; les préférences trophiques des vecteurs ; le comportement de défense des hôtes ; la densité et la diversité des vecteurs et des hôtes.

### **1.3.1 Préférences écologiques et cycles d'activité**

Un cycle d'amplification ne peut exister que si les hôtes et les vecteurs partagent, à une même période, la même niche écologique. Leur probabilité de rencontre dépend de leur répartition réciproque dans l'espace et dans le temps, à l'échelle de la saison mais aussi celle du nycthémère.

Pour les oiseaux diurnes, la période principale d'exposition aux piqûres de moustiques est la nuit, quand ils sont inactifs et immobiles. Or, c'est justement à la tombée du jour et pendant la nuit que la plupart des moustiques ornithophiles partent en quête d'hôte et prennent leur repas de sang (Scott & Edman 1991). A l'échelle de la saison, on peut s'attendre à ce que les interactions entre oiseaux et vecteurs soient différentes selon que le pic d'abondance de ces derniers survient pendant la migration de printemps (nombreux oiseaux de passage), la nidification (nombreux poussins immobiles et sans plumage protecteur), ou la migration d'automne (nombreux jeunes de l'année et oiseaux de passage).

La rencontre entre les oiseaux et les moustiques est conditionnée par leur répartition dans l'espace, y compris verticale. En effet, pour certains vecteurs, les individus en quête d'hôte sont plus abondants au niveau de la canopée qu'au niveau du sol (Stamm 1966, Chunikhin 1973, Anderson *et al.* 2004, Deegan *et al.* 2005, Russell & Hunter 2005, Balenghien *et al.* 2006, Darbro & Harrington 2006). En fonction de la hauteur à laquelle ils se trouvent pendant la nuit, les oiseaux seront plus ou moins exposés à ces moustiques. En général, le critère utilisé pour évaluer cette exposition est la hauteur des nids (Emord & Morris 1984).

### **1.3.2 Préférences trophiques des vecteurs**

En fonction des espèces, les moustiques sont attirés par une gamme d'hôtes plus ou moins large. Les moustiques ornithophiles choisissent en général un oiseau pour effectuer leur repas sanguin mais ils peuvent également piquer d'autres vertébrés (Chunikhin 1973).



Le tropisme des moustiques dépend de différents facteurs relatifs à l'hôte (odeur, émission de CO<sub>2</sub>, chaleur, mobilité, forme) et à l'environnement extérieur (température, humidité) (Chunikhin 1973, Scott & Edman 1991, Russell & Hunter 2005). L'attractivité d'un individu dépend de son espèce et de son âge. Chez le Moineau domestique *Passer domesticus* par exemple, il a été montré que les jeunes poussins au nid exercent une attraction chimique beaucoup plus faible que les moineaux adultes (Scott *et al.* 1990, Scott & Edman 1991).

### 1.3.3 Comportement de défense des oiseaux

Chez les oiseaux adultes, les zones attaquées par les moustiques sont les parties sans plumes telles que le contour de l'œil, la base du bec ou les pattes. Deux attitudes de protection sont décrites : (1) une protection passive, qui consiste à minimiser la surface exposée aux piqûres (protection de la tête par les ailes et des pattes par les plumes abdominales) ; (2) une protection active, qui consiste à effectuer des mouvements dissuasifs pour empêcher les moustiques de se poser (par exemple en secouant la tête, en tapant du pied, en donnant des coups de becs sur les pattes) ou à tenter d'attraper les moustiques en vol (Edman & Kale 1970, Scott & Edman 1991).

Les modalités de défense des oiseaux sont variables même entre espèces très proches phylogénétiquement (Edman *et al.* 1972) mais les espèces de grande taille, par exemple de la famille des Ardéidés ou des Anatidés, apparaissent globalement plus tolérantes aux piqûres de moustiques que les petits passereaux (Scott & Edman 1991). L'âge est un facteur important puisque les jeunes poussins au nid, qui n'ont pas de protection par des plumes, n'ont pas non plus de comportement de défense (sauf chez les Gallinacés). C'est pourquoi, bien qu'ils attirent moins les moustiques que les adultes, les poussins de moineaux seraient plus piqués que ces derniers : les vecteurs seraient attirés par l'adulte mais piqueraient ensuite préférentiellement les poussins dont le corps n'est pas entièrement protégé par celui du moineau adulte qui les couve (Scott *et al.* 1990). L'état physiologique intervient également, un individu léthargique n'ayant pas de comportement de défense vis-à-vis des moustiques (Scott & Edman 1991). Cette situation est observée, peu avant leur mort, chez les corneilles d'Amérique *Corvus brachyrhynchos* infectées par le virus WN (Yaremych *et al.* 2004a, Reisen *et al.* 2005a).

### 1.3.4 Densité et diversité des vecteurs

Pour qu'un arthropode ait un rôle significatif dans la transmission d'un agent pathogène, il faut que sa densité de population soit suffisamment grande. En effet, même s'il est un très bon vecteur, un moustique rare ne jouera aucun rôle épidémiologique. Inversement, un moustique dont la compétence vectorielle est modérée, mais qui est très abondant, pourra jouer un rôle majeur dans la transmission d'un arbovirus. Il existe donc, pour les vecteurs, une

densité critique en dessous de laquelle la transmission ne peut avoir lieu (Rodhain & Perez 1985).

Toutefois, quand la densité augmente fortement, une modification des relations vecteurs–oiseaux peut être observée. Des investigations en laboratoire ont montré que l’augmentation de la densité de moustiques entraîne une augmentation significative du comportement de défense des oiseaux (Edman *et al.* 1972, Scott & Edman 1991). Il en résulte que, pour un moustique donné, la probabilité de succès de repas sanguin sur un oiseau est plus faible quand la densité de moustiques augmente. Les moustiques pourraient alors être amenés à se tourner vers d’autres hôtes vertébrés, par exemple les mammifères. Ainsi, il a été montré que, quand la densité de certains moustiques ornithophiles est très élevée, la proportion de repas sanguins effectués sur mammifères augmente significativement (Edman & Taylor 1968, Nelson *et al.* 1976).

En outre, dans un environnement donné, la présence simultanée de vecteurs n’ayant pas les mêmes caractéristiques (compétence vectorielle, préférences écologiques, préférences trophiques, longévité, dynamique saisonnière) complique très probablement la circulation du virus au sein de la population d’oiseaux. En Camargue, par exemple, le rôle relatif des deux principales espèces de moustiques ornithophiles (*Cx. pipiens* et *Cx. modestus*) dans l’amplification du virus WN reste à évaluer.

### 1.3.5 Densité et diversité des oiseaux

La dynamique de transmission du virus WN au sein d’une population d’oiseaux est corrélée de façon complexe à la taille de cette population, la nature des espèces présentes et l’abondance relative de chaque espèce.

Par exemple, si une augmentation de la densité d’oiseaux concerne des espèces fortement compétentes, la transmission du virus au sein de la population de vecteurs est favorisée. Cela correspond à la situation épidémiologique observée en Californie où le niveau d’infection des populations de vecteurs par le virus WN est particulièrement élevé dans les zones à forte densité de Corvidés (Reisen *et al.* 2006a). Ceux-ci ayant une mortalité élevée associée au virus WN (Yaremych *et al.* 2004b), ils ne peuvent en effet intervenir de façon significative dans la transmission que s’ils ont une population de grande taille (Dobson & Foufopoulos 2001). De la même façon, une augmentation de la diversité des oiseaux qui a pour conséquence de rassembler des hôtes ayant un rôle complémentaire dans la circulation du virus (par exemple, des individus réservoirs ou introducteurs et d’autres très bons amplificateurs) favorise l’amplification (Dobson & Foufopoulos 2001). Inversement, si l’augmentation de densité ou de diversité concerne des oiseaux peu ou pas amplificateurs, elle entraîne un effet de dilution du virus (Schmidt & Ostfeld 2000, Dobson & Foufopoulos 2001,

Ezenwa *et al.* 2005). Celui-ci est moins présent chez les espèces d'oiseaux capables de le transmettre aux vecteurs et le cycle d'amplification est ralenti.

Selon les caractéristiques des espèces présentes (bons ou mauvais amplificateurs), la densité et la diversité pourront donc avoir des effets contraires sur l'amplification du virus WN au sein de l'avifaune. C'est pourquoi, selon les hypothèses de transmission choisies, les modèles épidémiologiques relatifs au virus WN peuvent aboutir à des prédictions très différentes (Wonham *et al.* 2006).

## **1.4 Une météorologie favorable**

Pour que l'amplification soit importante, il est nécessaire que les conditions météorologiques, en particulier de température, soient favorables. En effet, elles conditionnent non seulement l'abondance et l'activité des moustiques, mais aussi la période d'incubation extrinsèque, qui correspond au temps nécessaire à l'amplification du virus chez les vecteurs (Rodhain 1989, Mellor 2004, Reisen *et al.* 2006c).

## **2 Autres voies d'amplification**

D'autres facteurs pourraient également jouer un rôle clé dans l'amplification du virus WN, en particulier si celle-ci ne repose pas uniquement sur un cycle primaire oiseau-moustique-oiseau. D'autres mécanismes de transmission sont en effet suspectés : une transmission non vectorielle ; une transmission vectorielle non virémique ; une transmission vectorielle chez des vertébrés autres que des oiseaux ; une transmission vectorielle par des arthropodes autres que des moustiques.

### **2.1 Transmission non vectorielle**

La possibilité d'une transmission d'oiseau à oiseau en l'absence de moustiques a été mise en évidence pour différentes espèces en conditions de laboratoire (Langevin *et al.* 2001, McLean *et al.* 2001, Swayne *et al.* 2001, Banet-Noach *et al.* 2003b, Komar *et al.* 2003a). En conditions naturelles, cette transmission non vectorielle pourrait s'avérer particulièrement importante pour les espèces qui vivent en communauté (Banet-Noach *et al.* 2003b, Marra *et al.* 2004, Ward *et al.* 2006). Elle implique que le virus soit excrété par les individus infectés (fèces, salive, sécrétions naso-pharyngées, fluides oculaires), qu'il survive dans l'environnement, et qu'il infecte un nouvel hôte par voie orale, respiratoire, muqueuse ou cutanée (Kuno 2001b).

Le virus WN a été mis en évidence à plusieurs reprises dans la cavité oro-pharyngée d'oiseaux infectés (Langevin *et al.* 2001, Komar *et al.* 2002, Komar *et al.* 2003a). La présence du virus a aussi été observée dans les fientes chez plusieurs espèces domestiques, notamment

le poulet (Senne *et al.* 2000, Kuno 2001b, Langevin *et al.* 2001), la dinde (Swayne *et al.* 2000) et le canard (Fedrova et Stavskiy 1972 cité par Kuno 2001b). Chez les oiseaux sauvages, le virus WN a été détecté sur des écouvillons cloacaux de plusieurs espèces américaines infectées expérimentalement (Komar *et al.* 2003a, Weingartl *et al.* 2004) ou naturellement (Komar *et al.* 2002). Néanmoins, la survie du virus dans les fientes serait limitée dans le temps : à température ambiante, la quantité de virus détectée chuterait de 99% en 24 heures (Langevin *et al.* 2001).

Les modalités selon lesquelles la transmission d'oiseau à oiseau se produit sont mal connues. La possibilité d'une infection suite à l'inhalation d'aérosols contaminés par le virus WN a été démontrée au laboratoire sur des singes, des souris et des hamsters (Kuno 2001b). Chez les oiseaux, la production d'aérosols à partir de fientes contaminées pourrait être induite par les battements d'ailes et entraîner la contamination de congénères par voie respiratoire. Par ailleurs, les contacts sociaux entre individus pourraient faciliter la mise en contact d'un oiseau naïf avec des sécrétions ou excréments contaminés. Les poussins, en particulier, pourraient être infectés par leurs parents à l'occasion du nourrissage par régurgitation (Kuno 2001b).

La possibilité d'une contamination par voie orale a été prouvée expérimentalement chez cinq espèces d'oiseaux sauvages par administration dans la cavité buccale d'une solution virale ou d'un moustique infecté (Komar *et al.* 2003a). Cette voie d'infection pourrait être particulièrement importante pour les oiseaux de proie et les charognards qui se nourrissent d'autres oiseaux. On peut d'ailleurs remarquer que le virus est fréquemment observé chez les rapaces (Anderson *et al.* 1999, Garmendia *et al.* 2000, Gancz *et al.* 2005, Stout *et al.* 2005, Wunschmann *et al.* 2005, Bakonyi *et al.* 2006, Hull *et al.* 2006, Joyner *et al.* 2006). De même, chez les Corvidés, la transmission du virus pourrait être accrue du fait de leur comportement charognard (Marra *et al.* 2004). Enfin, le virus WN pourrait aussi être transmis aux oiseaux par ingestion de moustiques ou d'autres arthropodes infectés. Cette situation est envisageable pour des espèces insectivores mais aussi pour d'autres espèces, par exemple lors du comportement de défense vis-à-vis des moustiques ou de l'entretien mutuel du plumage.

## **2.2 Transmission vectorielle non virémique**

La possibilité pour le virus WN d'être transmis directement d'un moustique à un autre, sans passage par la circulation sanguine de l'hôte, a été montrée expérimentalement sur un modèle souris (Higgs *et al.* 2005). Ce mécanisme de transmission non systémique avait déjà été décrit pour les tiques (Lawrie *et al.* 2004). Chez les oiseaux, la transmission non virémique du virus WN serait favorisée par le fait que les moustiques se concentrent pour piquer leur hôte sur les parties du corps dénuées de plumes (contour de l'œil, base du bec, pattes). Quand la densité de moustiques est importante, l'amplification du virus WN pourrait donc être accélérée, grâce à une augmentation du nombre de vecteurs infectés, même si les

hôtes présents sont de mauvais amplificateurs. Les oiseaux immunisés ou peu compétents et les différents hôtes considérés jusqu'à présent comme des culs-de-sac épidémiologiques pourraient donc en réalité permettre passivement l'amplification du virus WN chez les vecteurs.

### **2.3 Hôtes amplificateurs autres que les oiseaux**

La présence d'anticorps vis-à-vis du virus WN a été rapportée chez de nombreux mammifères domestiques ou sauvages (Hubalek & Halouzka 1999, McLean *et al.* 2002, Marra *et al.* 2004, van der Meulen *et al.* 2005). En revanche, les isolements sont rares (Taylor *et al.* 1956, Berezin 1971, Hubalek & Halouzka 1999). Les infections expérimentales sur différentes espèces ont montré que la virémie développée après inoculation du virus est en général faible chez les mammifères (Taylor *et al.* 1956, Schmidt & Elmansoury 1963, Chippaux *et al.* 1970, Joubert *et al.* 1971, Oudar *et al.* 1971b, Bunning *et al.* 2002, McLean *et al.* 2002, Austgen *et al.* 2004, Teehee *et al.* 2005). Ceux-ci sont donc considérés comme moins importants que les oiseaux dans le maintien du cycle de transmission du virus WN (Hubalek & Halouzka 1999). Toutefois, des études récentes sur des rongeurs (Tonry *et al.* 2005) et des lagomorphes (Tiawsirisup *et al.* 2005) laissent penser que le rôle des mammifères dans la circulation du virus a peut-être été sous-estimé.

La circulation du virus WN a aussi été montrée chez les reptiles et les amphibiens (Berezin 1971, Nir *et al.* 1972). Les investigations menées jusqu'à présent ont montré qu'une virémie suffisante pour infecter des moustiques vecteurs est observée chez certaines espèces mais pas chez d'autres (McLean *et al.* 2002, Klenk & Komar 2003, Klenk *et al.* 2004). Certains reptiles et amphibiens pourraient donc aussi avoir un rôle significatif dans l'amplification du virus WN.

### **2.4 Transmission par des vecteurs autres que les moustiques**

Le virus WN a été détecté chez des Cératopogonidés (Sabio *et al.* 2006) et chez divers ectoparasites des oiseaux : Hippoboscidés (Farajollahi *et al.* 2005b, Gancz *et al.* 2005), tiques dures (Hubalek & Halouzka 1999, Murgue *et al.* 2002, Lvov *et al.* 2004), tiques molles (Hubalek & Halouzka 1999, Murgue *et al.* 2002, Lvov *et al.* 2004, Mumcuoglu *et al.* 2005) et autres acariens nidicoles (Mumcuoglu *et al.* 2005, Valiente Moro *et al.* 2005). Les tiques, en particulier, sont considérées comme des vecteurs potentiels (Hayes 1989, Lvov *et al.* 2004, Mumcuoglu *et al.* 2005).

La présence du virus chez ces ectoparasites hématophages ne permet cependant pas de conclure qu'ils sont des vecteurs de l'infection. Pour arriver à cette conclusion, il est nécessaire de démontrer expérimentalement que l'arthropode est un vecteur compétent, c'est-

à-dire qu'il est capable de se contaminer à partir d'un oiseau puis de transmettre le virus à un autre oiseau (Rodhain & Perez 1985, Eldridge 2000). De plus, pour pouvoir affirmer que le parasite joue réellement un rôle important dans l'amplification virale, il faut démontrer : (1) que des membres de la population de parasites se nourrissent fréquemment sur les oiseaux en conditions naturelles ; (2) qu'il existe une association biologique dans le temps et dans l'espace entre le virus et la présence de l'infection chez les oiseaux ; (3) que les parasites collectés en conditions naturelles sont fréquemment porteurs du virus (Eldridge 2000). En pratique, seule la compétence vectorielle de certaines tiques molles a été démontrée (Hurlbut 1956, Abbassy *et al.* 1993, Anderson *et al.* 2003, Lawrie *et al.* 2004, Hutcheson *et al.* 2005). En revanche, la présence du virus dans les ectoparasites laisse supposer qu'il existe un risque de contamination des oiseaux par voie orale si les parasites infectés sont ingérés, par exemple lorsque les oiseaux se lissent les plumes (Anderson *et al.* 2003, Komar *et al.* 2003a, Marra *et al.* 2004).

## Conclusion

Le système biologique hôtes–virus–vecteurs est extrêmement complexe et varie en fonction des souches virales, des populations d'hôtes, des populations de vecteurs et de l'environnement. La contribution relative des oiseaux (individus, espèces ou groupes d'espèces) au cycle de transmission du virus WN est très mal connue et varie, tout comme celle des vecteurs, en fonction de la zone géographique considérée (Rodhain & Perez 1985, Scott & Edman 1991). Une étude locale des foyers de transmission est donc nécessaire afin de comprendre comment s'effectue la circulation virale. C'est pourquoi, bien que les travaux sur le virus WN se soient multipliés depuis que ce virus a émergé sur le continent américain, une étude spécifique de sa circulation dans l'écosystème Camargue était nécessaire.



---

## ***CHAPITRE 2***

---

***Répartition spatio-temporelle  
des oiseaux sauvages de  
Camargue et espèces  
candidates à la circulation du  
virus West Nile***





# 1 Principe et objectifs

L'objet de cette partie est la **description de l'avifaune sauvage susceptible d'être impliquée dans la circulation du virus WN en Camargue.**

L'approche la plus intuitive, pour un épidémiologiste, serait probablement de capturer et tester les différentes espèces d'oiseaux sauvages présentes, afin de rechercher chez chacune d'elles la trace d'un contact avec le virus WN. Toutefois, en pratique, il n'est pas possible d'obtenir un échantillon de taille suffisante pour toutes les espèces d'oiseaux, d'autant plus que l'avifaune de Camargue est très diversifiée avec près de 300 espèces observées chaque année (Kayser *et al.* 2003, Isenmann 2004). Une approche exhaustive, prenant en compte les caractéristiques de l'avifaune présente, s'avère nécessaire dans un premier temps pour définir des **espèces candidates** pouvant ultérieurement faire l'objet d'investigations sur le terrain. Quels sont les oiseaux présents à proximité du foyer épizootique ? Combien sont-ils ? D'où viennent-ils ? La réponse à ces questions est essentielle pour identifier les espèces associées à la circulation du virus WN.

Les objectifs fixés étaient les suivants : (1) décrire les principaux mouvements migratoires des oiseaux de Camargue et en déduire les possibilités d'introduction du virus WN ; (2) établir une liste des oiseaux de Camargue susceptibles d'intervenir dans l'amplification et la dissémination du virus WN ; (3) identifier les oiseaux de Camargue susceptibles de jouer un rôle dans l'émergence du virus WN chez les hôtes sensibles.

## 2 Matériel et méthodes

Pour répondre à ces objectifs, nous avons recueilli des informations sur les mouvements migratoires, l'abondance (nombre d'individus) et la diversité (nombre d'espèces) des oiseaux de Camargue. Ces informations ont été obtenues à partir de données de la littérature, de résultats de suivi de l'avifaune de Camargue et d'investigations de terrain complémentaires.

### 2.1 Données sur les mouvements migratoires

Il existe de nombreuses méthodes pour l'étude du trajet migratoire des oiseaux (Alerstam 1990, Gauthier-Clerc & Le Maho 2001, Marchant 2002, Berthold *et al.* 2003, Wink 2006). Nous avons eu recours à deux d'entre elles : la reprise d'individus bagués et le suivi par télémétrie satellitaire.

#### 2.1.1 Reprises de bagues

Le baguage permet d'étudier le déplacement des oiseaux entre deux points A et B qui correspondent respectivement au lieu de capture et au lieu de recapture. Cette méthode est

utilisée depuis plus de cent ans pour étudier la migration des oiseaux (Jacquat 1999). Son principe est celui des techniques de capture, marquage et recapture : les oiseaux sont capturés, marqués (le plus souvent à la patte, avec une bague métallique), mesurés et, si possible, âgés et sexés ; ils sont ensuite relâchés.

Dans les années cinquante, à l'initiative de Luc Hoffmann, la Station Biologique de la Tour du Valat a mis en place en Camargue un programme quotidien de baguage d'oiseaux de toutes espèces. Nous avons considéré les données de reprises de bagues effectuées dans le cadre de ce programme pendant la **période 1950-1975** et publiées dans des comptes-rendus ornithologiques (Hoffmann 1955, Hoffmann 1956, Hoffmann & Leveque 1957, Hoffmann 1959, Hoffmann 1960, Hoffmann 1962, Hoffmann 1963, Hoffmann 1964, Hoffmann 1966, Hoffmann 1968, Hoffmann 1970, Johnson 1973, Johnson 1975a, Johnson 1975b).

Nous nous sommes en particulier intéressés aux oiseaux d'eau, ceux-ci étant susceptibles d'introduire le virus WN dans les zones humides de Camargue où les moustiques sont présents en abondance. Nous avons retenu sept espèces pour lesquelles un retour de bagues important était observé : le Canard colvert, la Sarcelle d'hiver *Anas crecca*, la Sarcelle d'été *Anas querquedula*, le Fuligule morillon *Aythya fuligula* (toutes les quatre de la famille des Anatidés), la Foulque macroule *Fulica atra* (famille des Rallidés) et la Bécassine des marais *Gallinago gallinago* (famille des Scolopacidés). Nous avons également recueilli les données relatives au Héron pourpré *Ardea purpurea* (famille des Ardeidés) pour comparer les résultats observés avec ceux obtenus par télémétrie satellitaire.

### 2.1.2 Télémétrie satellitaire

Le système Argos est un système de localisation et de collecte de données par satellite, réservé à l'étude de l'environnement, dont les premières applications en ornithologie remontent aux années 1980 (Howey 1992, Fuller *et al.* 1995). Par rapport au baguage, l'intérêt majeur de cette approche est de permettre le suivi des déplacements d'un même individu sur une période de temps pouvant aller jusqu'à plusieurs années. Les données de localisation n'étant toutefois pas très précises, l'utilisation de ce système est réservée à l'étude des déplacements sur de grandes distances, tels que ceux effectués par les oiseaux pendant la migration (Britten *et al.* 1999). Pour chaque oiseau équipé d'une balise Argos, le trajet individuel entre site d'hivernage et site de reproduction peut être décrit.

Le principe de fonctionnement du système Argos est le suivant : (1) l'émetteur de la balise Argos (portée par l'oiseau) envoie automatiquement des messages qui sont reçus par des satellites en orbite terrestre basse ; (2) les satellites relaient les messages vers des stations de réception terrestres ; (3) les stations de réception terrestres transmettent automatiquement les messages vers les centres de traitement Argos ; (4) les centres de traitement reçoivent les données brutes Argos (extraites de l'ensemble des données en provenance des satellites),

déterminent la position des émetteurs, traitent les données fournies par les capteurs et distribuent les résultats aux utilisateurs. Les localisations sont calculées à partir des différents messages reçus au cours d'un passage satellite. En fonction de la qualité de ces informations (conditions géométriques du passage satellite traité, nombre de messages reçus pendant le passage, stabilité en fréquence de l'émetteur), elles sont réparties en différentes classes de précision.

En décrivant précisément la localisation des sites d'hivernage et des sites de repos utilisés pendant la migration de printemps, la télémétrie satellitaire peut aider à identifier des zones où les oiseaux migrateurs sont susceptibles de devenir infectés par le virus WN. Nous avons choisi pour modèle le **Héron pourpré** qui est, comme nous le verrons par la suite (cf. *article 2*), l'une des rares espèces candidates à l'introduction du virus WN en Camargue depuis les foyers de circulation africains, dont le poids est supérieur à un kilogramme. Il peut donc être équipé avec une balise Argos de 30 grammes sans que celle-ci ne soit une entrave à ses déplacements.

Dans le cadre du programme de recherche « S2E MIGRATEURS », six balises *Microwave Telemetry Inc.* de 30 grammes ont été mises à notre disposition par le Centre National d'Etudes Spatiales (CNES) pour réaliser ce suivi télémétrique. Malgré la survie plus faible des jeunes hérons pourprés, notamment durant leur première année, nous avons fait le choix d'équiper des poussins plutôt que des individus adultes car la capture de ces derniers aurait nécessité une forte et longue pression de dérangement sur cette espèce sensible en Camargue (Hafner *et al.* 2004). Six poussins ont donc été équipés d'une balise Argos le 2 juillet 2004.

Il a été choisi de mettre un point de rupture sur les harnais d'attache des balises afin de limiter le temps de dérangement des oiseaux : l'objectif est d'éviter qu'ils ne soient pénalisés par la présence de la balise une fois la durée d'émission terminée. Le ruban de téflon servant de harnais a dans ce but été sectionné puis recousu avec du fil chirurgical résorbable. La technique d'harnachement adoptée est celle décrite pour les grues cendrées *Grus grus* (Nagendran *et al.* 1994) à la différence près que le point de rupture a été préparé à l'avance afin de limiter autant que possible le temps de dérangement dans la colonie.

## **2.2 Indices d'abondance et de diversité**

Les données relatives aux déplacements des oiseaux en dehors de la Camargue étaient destinées à mieux évaluer le risque d'introduction du virus WN en Camargue. Pour étudier les possibilités de circulation du virus une fois qu'il a été introduit, des connaissances sur les espèces présentes en Camargue, en particulier pendant la saison d'activité des moustiques, étaient nécessaires. Nous avons considéré deux types de données complémentaires : le nombre des oiseaux présents (ou abondance) et le nombre des espèces présentes (ou diversité). Ces données ont été estimées à deux échelles spatiales : une échelle régionale d'une part, prenant en compte l'avifaune de toute la Camargue ; et une échelle locale d'autre part, focalisée sur l'environnement direct des écuries.

### 2.2.1 A l'échelle de la Camargue

Grâce à un suivi ornithologique régulier depuis de nombreuses années (cf. *annexe 1*), l'avifaune de Camargue est aujourd'hui relativement bien connue. Ces connaissances générales ont été utilisées pour établir un **indice mensuel d'abondance** pour chacune des 289 espèces d'oiseaux régulièrement observées en Camargue (Kayser *et al.* 2003). Cet indice *ad hoc* est simplement défini selon une échelle logarithmique (catégories : 0, 1, 10, 100, 1000, 10000). Il est donc peu précis. Par ailleurs, en faisant la somme des différentes espèces présentes (catégories autres que zéro pour l'indice mensuel d'abondance), nous avons établi un **indice mensuel de diversité**.

Ces données ont été utilisées pour : (1) décrire au cours d'une année les variations d'abondance et de diversité des espèces migratrices susceptibles d'introduire des agents pathogènes en Camargue (cf. *article 1*) ; (2) identifier les espèces potentiellement impliquées dans la circulation du virus WN en Camargue (cf. *article 2*).

### 2.2.2 Aux environs des écuries

Les moustiques suspectés d'être vecteurs du virus WN ayant des déplacements restreints (Mouchet *et al.* 1970, Balenghien 2006), un moustique qui infecte un cheval à proximité d'une écurie s'est probablement lui-même contaminé dans un périmètre proche. Les oiseaux étant considérés comme les principaux hôtes amplificateurs du virus WN (cf. *chapitre 1*), la description de l'avifaune présente sur le site des écuries positives peut permettre d'identifier les espèces potentiellement impliquées dans l'émergence du virus chez les chevaux de Camargue.

Plusieurs cas d'infection par le virus WN s'étant déclarés sur des chevaux de Camargue à partir du 28 août 2004 (Zeller *et al.* 2004), des comptages en vue de décrire les espèces et les effectifs des oiseaux présents aux environs des écuries ont été effectués à l'automne 2004 dans plusieurs écuries ayant une suspicion de cas (n=12). Ces écuries ont été visitées entre le 28 septembre et le 29 octobre 2004, soit une à quatre semaines après la déclaration de cas suspect. Les écuries pour lesquelles la suspicion n'a pas été confirmée (n=2) ont ensuite été retirées de l'étude.

Les comptages ont été réalisés par un ornithologue de la Tour du Valat (Yves Kayser). La méthode utilisée (itinéraires échantillons) consistait à noter, pendant 20 minutes, tous les oiseaux observés ou entendus dans un rayon de 500 mètres autour des principaux bâtiments.

### 3 Résultats et discussions

Cette première approche, visant à identifier au sein de l'avifaune de Camargue des espèces candidates à la circulation du virus WN, a fait l'objet de deux publications qui figurent à la fin de ce manuscrit. Dans cette partie, ces publications sont replacées dans leur contexte mais seuls les résultats non indiqués dans ces articles sont présentés et discutés.

#### **3.1 Périodes à risque pour l'introduction de pathogènes en Camargue**

##### Article 1

*En révision : revue Emerging Infectious Diseases*

Jourdain E., Gauthier-Clerc M., Bicout D., Sabatier P.

***Bird migration routes and pathogen dispersion risk into western Mediterranean wetlands***

*Cet article a pour objectif d'apporter une description générale des mouvements de l'avifaune sauvage dans le Paléarctique ouest. Ces données très simples peuvent en effet aider à mieux comprendre dans quelle mesure les oiseaux migrateurs sont susceptibles d'introduire en Camargue des agents infectieux tels que le virus WN.*

#### **3.2 Oiseaux candidats à l'introduction, l'amplification et la dispersion du virus West Nile en Camargue**

##### Article 2

*Accepté : revue Vector Borne and Zoonotic Diseases*

Jourdain E., Toussaint Y., Leblond A., Bicout D., Sabatier P., Gauthier-Clerc M.

***Bird species potentially involved in introduction, amplification and spread of West Nile virus in a Mediterranean wetland, the Camargue (southern France)***

*Cet article traite de l'importance d'identifier les oiseaux potentiellement impliqués dans l'introduction, l'amplification et la dissémination locale du virus WN en Camargue. Dans ce but, les oiseaux de Camargue sont classés en tenant compte : d'une part, des données de la littérature sur le virus WN chez les oiseaux de l'Ancien Monde et, d'autre part, de facteurs relatifs à l'écologie des oiseaux de Camargue, tels que le statut migrateur, la zone de*

provenance, l'abondance et la période de présence en Camargue. Les listes d'oiseaux obtenues et différents scénarios de circulation du virus WN en Camargue sont ensuite discutés.

Ce travail a également fait l'objet d'une thèse vétérinaire (Toussaint 2003).

### **3.3 Comptages autour des écuries et oiseaux candidats à l'émergence du virus West Nile en Camargue**

La liste des espèces présentes dans au moins la moitié des écuries avec cas confirmé de WN est indiquée dans le **tableau I**. Les comptages ayant eu lieu en octobre, la population d'oiseaux observée regroupe à la fois des nicheurs sédentaires, des hivernants déjà arrivés, des nicheurs migrateurs encore présents et des migrateurs de passage. On peut supposer que les espèces les plus probablement impliquées dans la circulation du virus sont celles observées dans tous les sites (Moineau domestique, Moineau friquet *Passer montanus*, Mésange charbonnière *Parus major*) ou presque tous les sites (Pie bavarde, Pouillot véloce *Phylloscopus collybita*, Bergeronnette grise *Motacilla alba*, Bouscarle de Cetti *Cettia cetti*, Rouge-gorge *Erithacus rubecula*).

Comme le montre le **tableau I**, ces comptages d'automne font particulièrement ressortir les espèces hivernantes et de passage. Or, il s'est écoulé un certain délai de temps entre le moment où les vecteurs se sont infectés sur les oiseaux et celui où nous avons effectué les comptages, pour les raisons suivantes : (1) un moustique qui pique un oiseau infecté n'est capable de retransmettre le virus qu'après un certain délai (période d'incubation extrinsèque) dont la durée est d'environ une à deux semaines (plutôt une semaine quand la température est élevée, ce qui est souvent le cas en fin d'été) (Balenghien 2006) ; (2) l'apparition des cas cliniques chez le cheval se produit plusieurs jours après la piqûre par un moustique infecté (incubation) (Oudar *et al.* 1971a, Bunning *et al.* 2002) ; (3) les comptages d'oiseaux ont été réalisés une à quatre semaines après la déclaration de cas suspect par les autorités. Par conséquent, il est probable que ces comptages d'automne surestiment l'importance des hivernants et des oiseaux de passage dans la transmission du virus WN aux chevaux.

Parmi les espèces comptées à l'automne, ce sont donc les **espèces nicheuses sédentaires**, telles que les moineaux et les pies, qui apparaissent comme les meilleures candidates pour la transmission du virus WN aux chevaux. L'analyse des résultats d'autres comptages, effectués aux mois de mai et juillet, est actuellement en cours. Ces comptages permettront de mieux décrire l'avifaune nicheuse, y compris migratrice, plus représentative des espèces présentes à proximité des écuries durant la dernière quinzaine d'août. De plus, nous avons considéré des **écuries témoins**, dans lesquelles aucun cheval séropositif n'a été détecté, qui permettront de déterminer si l'avifaune observée autour des écuries positives peut être considérée comme un

facteur de risque de circulation du virus WN ou si elle est simplement représentative de l'avifaune habituellement associée à l'élevage de chevaux.

**Tableau I :** Résultat des comptages effectués en Camargue autour des écuries avec cas confirmé de WN à l'automne 2004. Seules les espèces d'oiseaux observées dans au moins 5 écuries sont présentées (le nombre total d'écuries étant de 10). Le statut migrateur des espèces est indiqué : NS nicheur sédentaire, NM nicheur migrateur, H hivernant, P migrateur de passage. La fréquence indique le nombre d'écuries dans lesquelles l'espèce est observée. L'abondance indique le nombre moyen d'oiseaux observés dans les sites où l'espèce est présente : + toujours moins de 5 individus ; ++ parfois 5 individus ou plus ; +++ parfois 10 individus ou plus ; ++++ parfois 30 individus ou plus.

Famille	Espèce (français)	Espèce (latin)	NS	NM	H	P	Fréquence	Abondance
Passeridés	Moineau domestique	<i>Passer domesticus</i>	X					++++
	Moineau friquet	<i>Passer montanus</i>	X		X		10	+++
Paridés	Mésange charbonnière	<i>Parus major</i>	X		X			+
Corvidés	Pie bavarde	<i>Pica pica</i>	X				9	++
Sylviidés	Pouillot véloce	<i>Phylloscopus collybita</i>			X	X		++
Motacillidés	Bergeronnette grise	<i>Motacilla alba</i>			X	X		++
Sylviidés	Bouscarle de Cetti	<i>Cettia cetti</i>	X		X	X	8	++
Turdidés	Rouge-gorge	<i>Erithacus rubecula</i>	X		X	X		++
Sturnidés	Etourneau sansonnet	<i>Sturnus vulgaris</i>	X		X	X		++++
Fringillidés	Chardonneret élégant	<i>Carduelis carduelis</i>	X		X	X	7	++
Alcidinidés	Martin pêcheur d'Europe	<i>Alcedo atthis</i>	X		X	X		+
Alaudidés	Cochevis huppé	<i>Galerida cristata</i>	X					+
Columbidés	Tourterelle turque	<i>Streptopelia decaocto</i>	X			X	6	+
Corvidés	Corneille noire	<i>Corvus corone</i>	X					+
Corvidés	Choucas des tours	<i>Corvus monedula</i>	X					++
Hirundinidés	Hirondelle rustique	<i>Hirundo rustica</i>			X	X		++
Motacillidés	Bergeronnette printanière	<i>Motacilla flava</i>		X		X		++
	Bergeronnette des ruisseaux	<i>Motacilla cinerea</i>			X	X	5	+
Laridés	Goéland leucopnée	<i>Larus michahellis</i>	X					+
Turdidés	Tarier pâte	<i>Saxicola torquata</i>	X		X	X		+

### 3.4 Suivi satellitaire de jeunes hérons pourprés

Six balises Argos (942 à 947) ont été posées le 2 juillet 2004 sur six poussins de Héron pourpré appartenant à une même colonie. Les signaux de deux balises ont été perdus avant le départ des individus en migration : l'un rapidement après la pose (943) et l'autre début septembre (944). Cette perte de signal indique soit un arrêt d'émission de la balise, soit la mort de l'oiseau (la balise pouvant par exemple se retrouver dans l'eau).

Les localisations hors de Camargue observées pour les quatre oiseaux restants sont indiquées sur la **figure 3**. Les données relatives aux balises 945 et 947 permettent de montrer que le **départ** en migration de ces oiseaux a eu lieu entre le 10 et le 15 septembre. Une direction sud sud-ouest a été adoptée par les quatre hérons pour traverser la Méditerranée avec un passage à proximité des Baléares (942 et 947) avant d'arriver sur le continent africain en Algérie, entre Oran et Alger (942, 945 et 947). Le **trajet** a ensuite été poursuivi en direction sud-ouest vers le Maroc (942 et 945) ou la Mauritanie (947).

Pendant la période qui précède le départ en migration, les jeunes hérons semblent avoir commencé à se déplacer dans diverses directions. Par exemple, le héron portant la balise 945

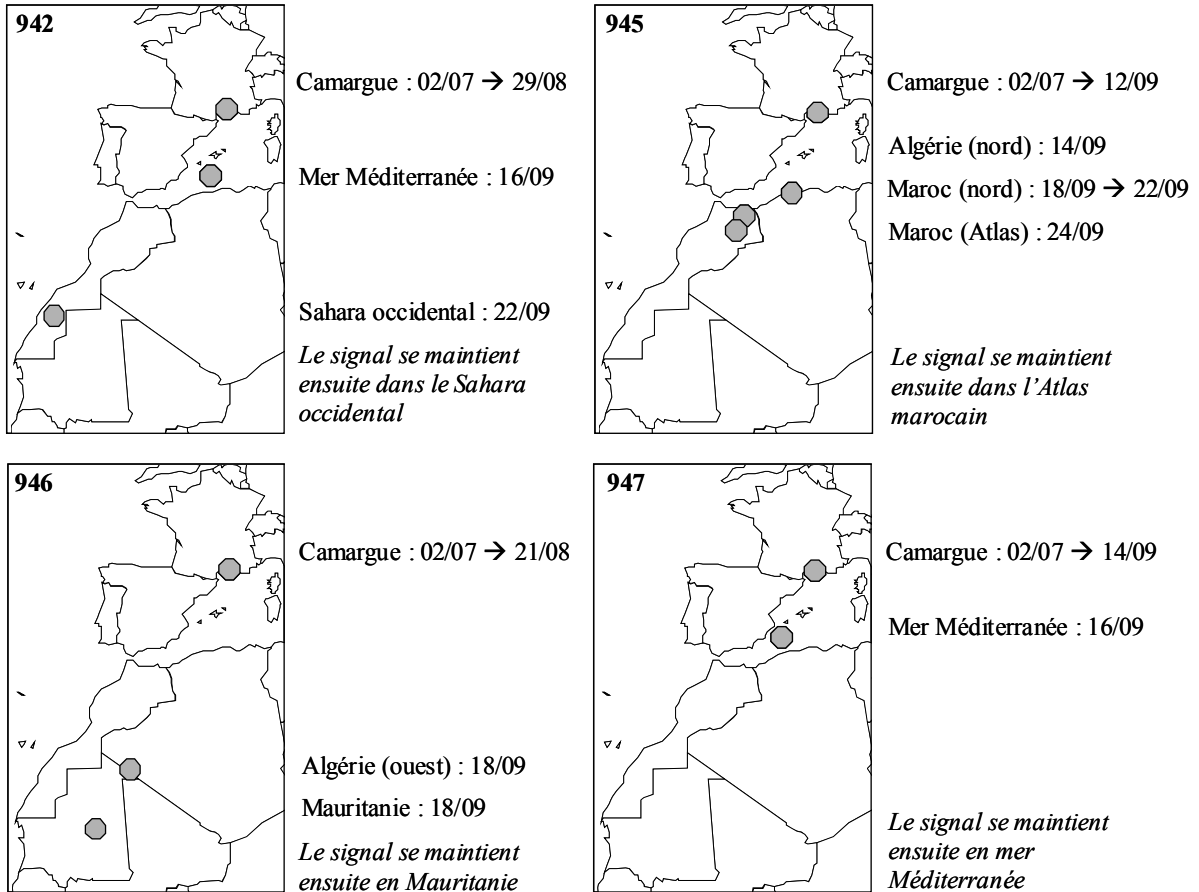


pourrait être monté temporairement vers le nord puisqu'il a été signalé en Camargue le 05/08 puis vers Alès le 09/08 puis à nouveau en Camargue le 15/08. Le héron portant la balise 946 semble quant à lui avoir quitté la Camargue vers le 21/08 pour se rendre plus à l'ouest, dans le Golfe de Lion à proximité de Perpignan, où un signal a été détecté le 23/08. La balise a ensuite été contactée vers Carcassonne puis Andorre le 31/08, puis à nouveau dans le Golfe du Lion le 06/09. Ces déplacements sont plausibles car il est estimé que les jeunes hérons pourprés se dispersent dans toutes les directions avant d'entreprendre la migration d'automne (Voisin 1991). Toutefois, l'interprétation de ces différentes localisations est difficile car leur classe de précision est médiocre (classe B).

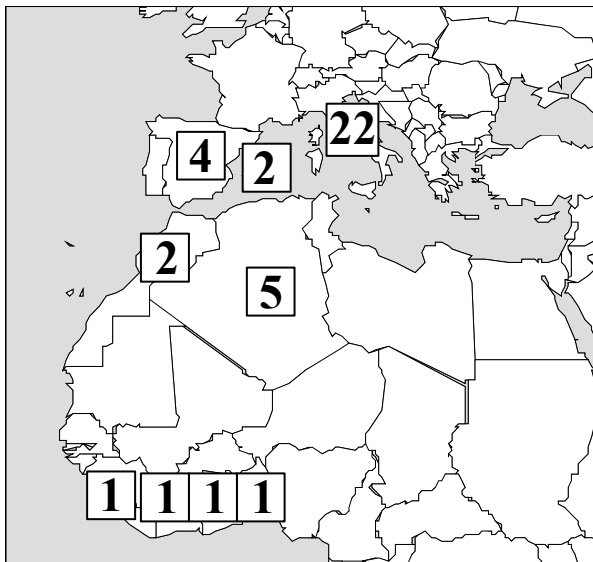
Une évaluation de la **vitesse** des oiseaux est possible quand deux signaux de bonne qualité sont détectés de façon rapprochée dans le temps. La balise 945 permet par exemple de montrer que l'oiseau correspondant, présent en Camargue mi-septembre, a gagné le nord de l'Algérie (à environ 800 kilomètres) deux jours plus tard. Les données relatives à la balise 946 sont particulièrement intéressantes puisqu'elles permettent de montrer que l'oiseau a effectué en 16 heures un trajet au dessus du Sahara d'environ 660 kilomètres, soit une vitesse moyenne de vol de 40 kilomètres par heure. Enfin, le suivi de la balise 942 permet de montrer que l'oiseau correspondant a mis au maximum six jours pour effectuer un trajet d'environ 2000 kilomètres de la Mer Méditerranée au Sahara occidental.

Malheureusement, le suivi du déplacement des oiseaux pendant leur migration d'automne n'est que partiel. Pour les quatre balises, le signal a cessé de se déplacer vers la mi-septembre. La signification peut être soit une perte de la balise par l'oiseau, soit la mort de celui-ci. Le synchronisme observé dans les dates d'arrêt de déplacement (18/09 pour 946 et 947, 22/09 pour 942, et 24/09 pour 945) est en faveur de la première hypothèse. Il est possible que le point de rupture, fabriqué sur les harnais avec du fil chirurgical résorbable pour des raisons éthiques, ait fonctionné plus rapidement que prévu. Par conséquent, nous n'avons pas pu obtenir d'information sur les sites d'hivernage et la migration de printemps de ces oiseaux.

Les données de reprises de bagues (**figure 4**) apparaissent cohérentes avec les résultats de suivi par télémétrie satellitaire. Les quatre hérons équipés d'une balise ont emprunté la voie de migration sud-ouest : aucun d'eux ne s'est dirigé vers l'Italie bien que deux voies migratoires soient suspectées de passer par ce pays (Voisin 1996). La carte de reprise de bagues suggère que l'Afrique de l'Ouest était leur destination finale probable pour l'hivernage.



**Figure 3** : Localisation et chronologie des contacts par télémétrie avec quatre hérons pourprés équipés d'une balise Argos en Camargue le 02/07/06. Seules les localisations obtenues avec une bonne précision sont représentées (classe 0, 1, 2, ou 3 ; sauf un point de classe A : balise 942 en Méditerranée le 16/09).



**Figure 4** : Pays dans lesquels des hérons pourprés bagués en Camargue entre 1950 et 1975 ont été retrouvés (n=39 sur 5017). Le nombre de bagues trouvées dans chaque pays est indiqué dans les carrés.



---

## ***CHAPITRE 3***

---

# ***Séroprévalence, isolement et phylogénie du virus West Nile chez les oiseaux de Camargue***



# 1 Principe et objectifs

L'objet de cette partie est **l'estimation de l'intensité de la circulation du virus WN chez les oiseaux de Camargue**.

Pour atteindre cet objectif, deux types d'indicateurs épidémiologiques peuvent être utilisés : la **prévalence sérologique**, c'est-à-dire le pourcentage d'oiseaux présentant des anticorps spécifiques du virus WN, et la **prévalence virale**, qui correspond au pourcentage d'oiseaux chez lesquels le virus peut être mis en évidence par une méthode directe (biologie moléculaire ou isolement).

Les investigations réalisées antérieurement par l'Office National de la Chasse et la Faune Sauvage (ONCFS) sur quelques espèces ont montré que **la prévalence virale et la prévalence sérologique attendues** en Camargue sont faibles. En effet, aucun des oiseaux morts analysés de 2000 à 2003 par le réseau national de surveillance du virus WN n'a été trouvé positif, et seulement quelques individus ont été trouvés positifs en sérologie en 2000, année pourtant épizootique (Hars *et al.* 2004, Hars *et al.* 2005a). D'après ces résultats préliminaires, et sachant que la probabilité de mettre en évidence des anticorps est plus élevée que celle de révéler la présence directe du virus chez les oiseaux, nous avons privilégié l'étude de la **séroprévalence** (prévalence sérologique) comme indicateur épidémiologique. Une récolte d'échantillons (oiseaux morts, ectoparasites) pour **recherche directe du virus** a toutefois été mise en oeuvre en complément en 2004. Cette approche s'étant révélée fructueuse (deux isolats), les oiseaux capturés durant la campagne de terrain de 2005 ont systématiquement fait l'objet de prélèvements visant à mettre en évidence non seulement la présence d'anticorps mais aussi celle de virus.

L'avifaune de Camargue (population cible) étant très abondante et diversifiée (cf. **chapitre 2**), nous avons dû choisir, parmi toutes ces espèces, une **population d'étude**. Le choix s'est basé sur des critères épidémiologiques (espèces susceptibles d'intervenir dans le cycle du virus WN, cf. **chapitre 2**), mais aussi sur des critères techniques (espèce facile à capturer et à prélever). Trois groupes d'oiseaux ont été sélectionnés en fonction de leur rôle possible dans l'épidémiologie du virus WN en Camargue : (1) des oiseaux migrateurs potentiellement introducteurs, (2) des oiseaux nicheurs coloniaux potentiellement amplificateurs et (3) des oiseaux sédentaires, souvent trouvés à proximité des habitations humaines, potentiellement amplificateurs et disséminateurs du virus.

## 2 Matériel et méthodes

Tous les individus capturés dans le cadre de notre étude ont été bagués avec des bagues du Muséum National d'Histoire Naturelle (Paris). Chaque oiseau a été identifié (espèce), sexé, âgé, pesé et soumis à différentes mesures biométriques. En cas de recapture, chaque individu était donc parfaitement identifié. Les échantillons ont ensuite été traités au **Centre National de**

**Référence (CNR) des arbovirus et fièvres hémorragiques** (Institut Pasteur, Lyon) pour partie en laboratoire P2 (ELISA indirect, ELISA par compétition, biologie moléculaire) et pour partie en laboratoire P3 (séroneutralisation, extraction d'ARN).

## **2.1 Protocole d'enquête**

Nous souhaitons pouvoir détecter une séroprévalence minimale de 1%. Nous avons donc pour objectif de prélever au minimum 300 oiseaux dans chacun des groupes étudiés. En effet, le nombre minimal d'oiseaux à prélever pour détecter la maladie dans une population infinie (taux de sondage inférieur à 10%) est de **299** pour une prévalence limite de 1% et un risque d'erreur de 5%.

### **2.1.1 Oiseaux migrateurs potentiellement introducteurs**

- *Population d'étude*

La population étudiée comprend différentes espèces de **passereaux migrateurs** arrivant de pays africains après leur traversée de la Méditerranée. La restriction de notre étude aux passereaux ayant hiverné en Afrique est justifiée par le fait que : (1) ces espèces arrivent simultanément de façon massive ; (2) sont plus faciles à capturer en grand nombre que la plupart des autres oiseaux migrateurs candidats à l'introduction du virus (cf. **chapitre 2**) ; (3) les passereaux sont considérés comme les principales espèces aviaires impliquées dans la circulation du virus WN (Komar 2000). Quelques migrateurs trans-Sahariens non passereaux, capturés dans les filets, sont venus s'ajouter à l'échantillon.

- *Méthode de capture*

Les oiseaux ont été capturés à l'aide de filets japonais disposés entre les premiers buissons situés en arrière de la plage.

- *Site de capture*

Le site choisi est la plage de Piémanson située au sud de Salins de Giraud. Cette plage est facilement accessible et un bosquet y est connu pour concentrer les passereaux arrivant à proximité (**Figure 5**).

- *Périodes de capture*

Les captures ont eu lieu du 1<sup>er</sup> avril au 12 mai 2004, c'est-à-dire au moment du pic de passage des migrateurs trans-sahariens.

• Méthode de prélèvement

- *Sang*

Le sang était prélevé à la veine alaire au moyen d'un tube capillaire hépariné après scarification de la peau à l'aide d'une aiguille 0,45 x 12. Une compression légère était ensuite réalisée avec un carré de coton. La quantité de sang recueillie par oiseau variait entre 10 et 200 microlitres.

Remarques :

- L'utilisation de tubes capillaires héparinés est indispensable pour permettre le prélèvement d'une quantité suffisante de sang, la coagulation étant très rapide lors de l'emploi de tubes capillaires secs.
- Les échantillons de faible volume se sont mal conservés et se sont avérés inutilisables pour les analyses de laboratoire. On comprend donc l'intérêt de diluer directement les prélèvements dans du PBS, comme cela est souvent pratiqué. L'inconvénient (et la raison pour laquelle nous n'avions pas choisi cette méthode) est que, comme le volume prélevé n'est pas toujours le même, la dilution obtenue est variable d'un échantillon à l'autre.

- *Ectoparasites*

Les tiques (et quelques autres ectoparasites) ont été prélevées au moyen d'une pince à tiques ou d'une petite pince à épiler. Seule la tête des oiseaux a fait l'objet d'une recherche minutieuse car c'est généralement la région la plus parasitée, tout au moins par les tiques dures.

• Traitement des prélèvements

- *Sang*

Les prélèvements sanguins étaient identifiés individuellement. Le sang collecté avec le tube capillaire était transféré immédiatement dans un tube de 200 µL (à l'aide d'une petite seringue injectant de l'air) puis mis en glacière (à environ +8 °C) jusqu'à la fin de la session de capture. Le sang était centrifugé (3 minutes à 3000 tours/min) soit sur le terrain, soit une fois de retour au laboratoire, et le plasma transféré dans un tube propre de 200 µL. Les échantillons étaient ensuite stockés à +4 °C. Ils ont tous été apportés à l'Institut Pasteur le 13 mai 2004 puis stockés à -20 °C.

- *Ectoparasites*

L'identification des tiques prélevées sur les oiseaux migrateurs peut s'avérer délicate, d'une part parce qu'il s'agit essentiellement de larves et de nymphes et, d'autre part, car certaines espèces peuvent être spécifiques des milieux africains. Nous avons tenté de conserver les tiques vivantes pour les faire identifier par des personnes compétentes (laboratoire de parasitologie, ENVL) avant de les congeler à -80 °C. Cette congélation est en effet nécessaire pour tenter un isolement viral. Chaque tique a été placée dans un tube sec de 500 µL contenant un fragment végétal (source d'humidité) ouvert régulièrement pour permettre un apport d'oxygène. Certaines tiques ayant été retrouvées mortes suite à une invasion du tube par des moisissures, les tiques survivantes ont été transférées dans des tubes préalablement perforés. Certaines sont alors mortes par dessiccation. L'identification n'a donc pu être effectuée précisément.



## 2.1.2 Oiseaux nicheurs coloniaux potentiellement amplificateurs

### • Population d'étude

Les poussins de deux espèces classées parmi celles potentiellement amplificatrices du virus WN en zone humide (cf. **chapitre 2**) ont été prélevées en vue d'investigations sérologiques. Ils s'agit de deux espèces coloniales communes en Camargue : le Héron garde-bœufs *Bubulcus ibis* et le Flamant rose.

- Le **Héron garde-bœufs** est un héron arboricole qui, pendant la saison de reproduction, vit en colonies avec d'autres espèces de héron. Nicheur en Camargue pour la première fois à la fin des années soixante, il a ensuite vu ses effectifs augmenter de façon exponentielle (Hafner *et al.* 2004). La population est migratrice partielle, 60 à 70% des individus (jeunes ou adultes) tentant chaque année d'hiverner en Camargue (Hafner *et al.* 2004), alors que les autres descendent vers l'Espagne ou l'Afrique. Majoritairement insectivore, il se nourrit fréquemment dans les prés à proximité du bétail et des chevaux pour augmenter son succès de capture de proies. Du fait de ce contact étroit avec les chevaux, cette espèce a été accusée par certains éleveurs camarguais d'être responsable de la contamination de leurs animaux après l'épizootie de WN en 2000.

- Le **Flamant rose** niche en Camargue sur l'étang du Fangassier, à proximité de Salins de Giraud. Emblématique de la Camargue, cette espèce fait l'objet d'un suivi scientifique depuis les années soixante (Johnson & Barbraud 2004). Le Flamant rose est l'un des oiseaux d'eau nicheurs parmi les plus abondants et il se déplace quotidiennement sur l'ensemble de la Camargue. La capture de poussins est organisée chaque année.

### • Méthode de capture

- Les poussins de hérons garde-boeufs ont été capturés au nid. Ceux-ci, souvent construits dans les arbres bas tels que les tamaris, sont en général accessibles.

- Les poussins de flamants roses, qui sont regroupés en crèche, ont été rabattus et capturés dans un corral.

### • Sites de capture

- Les poussins de hérons garde-boeufs ont été prélevés dans des colonies relativement faciles d'accès où cette espèce est abondante : majoritairement, étangs du Charnier et du Scamandre (**Figure 5**), mais également d'autres sites (Méjanès, Sollac, Tagès et étang de Bolmont).

- Les poussins de flamants roses sont capturés chaque année sur le site du Fangassier (**Figure 5**).

- Périodes de capture

- Poussins de hérons garde-bœufs : juin et juillet 2004 (entre le 23/06/04 et le 12/07/04) ;
- Poussins de flamants roses : juillet 2003. Les prélèvements n'ayant pas été analysés immédiatement, ils ont été inclus dans notre étude.

- Méthode de prélèvement

- Pour les hérons garde-bœufs, le sang a été prélevé à la veine alaire, comme précédemment, à l'aide de tubes capillaires héparinés (quantité recueillie : 50 à 300 µL).
- Les poussins de flamants roses ont été prélevés à la veine alaire à l'aide d'une seringue de 5 mL.

- Traitement des prélèvements

- Pour les hérons garde-bœufs, le sang a été traité comme indiqué précédemment pour les passereaux. Les prélèvements ont été apportés à l'Institut Pasteur le 3 août 2004 puis stockés à -20 °C.
- Pour les poussins de flamants roses, le sang total a été transféré dans des tubes avec anticoagulant (EDTA). Ils n'ont pas été centrifugés.

### 2.1.3 Oiseaux sédentaires potentiellement impliqués dans l'émergence

- Population d'étude

Trois espèces sédentaires et « péri-domestiques » (c'est-à-dire fréquentes à proximité des habitations humaines) ont été choisies parmi la liste des oiseaux candidats à l'amplification et l'émergence du virus WN (cf. **chapitre 2**) : le Moineau domestique, le Moineau friquet et la Pie bavarde.

- Le choix des **moineaux** est justifié par le fait que ces oiseaux ont été suspectés de jouer un rôle particulièrement important dans le cycle de transmission du virus WN en Europe (Komar 2000). En outre, on les trouve en nombre important autour des habitations en Camargue, notamment près des écuries (cf. **chapitre 2**).

- La **Pie bavarde** a été choisie du fait de son appartenance à la famille des Corvidés suspectée de jouer un rôle clé dans la circulation du virus WN sur le continent américain (Komar *et al.* 2000, Reisen *et al.* 2006a) et parce que plusieurs individus (n=4/18) avaient été trouvés séropositifs en 2000 (Hars *et al.* 2004).

Quelques oiseaux d'autres espèces (Corneille noire *Corvus corone*, Hirondelle rustique *Hirundo rustica*, Bouscarle de Cetti, Tourterelle turque *Streptopelia decaocto*, Tourterelle des bois *Streptopelia turtur*) ont aussi fait l'objet d'un prélèvement.

• Méthode de capture

Les oiseaux ont été capturés à l'aide de filets japonais (moineaux) ou de cages avec appelant (pies). Quelques pies capturées par des piègeurs camarguais dans de grands pièges à corvidés ont aussi fait l'objet d'un prélèvement.

• Sites de capture

- Les moineaux ont été capturés dans des sites faciles d'accès (autorisation du propriétaire, facilité de pose des filets). Il s'agit principalement de la Tour du Valat (Garcines et poulailler) et du Marais du Vigueirat (jardin et roselières) (**Figure 5**).

- En 2004, les pies ont été capturées essentiellement sur le domaine de la Tour du Valat, à l'exception de quatre pies à Astouin (nord des Saintes Mairies de la Mer), une au domaine de Bouyoli (sud d'Arles) et une au Vigueirat (à l'est, sur l'autre rive du Grand Rhône).

- En 2005, quatre zones d'étude ont été considérées pour les pies : le domaine de la Tour du Valat à l'est, Astouin et les S<sup>tes</sup> Mairies de la Mer au sud, la région située entre les étangs de Scamandre et Aigues-Mortes au nord-ouest, la commune de Générac au nord (**Figure 5**). Deux pies capturées au nord de l'étang du Vaccarès nous ont aussi été apportées par un piègeur. Pour chaque pie, les coordonnées GPS du site de capture ont été relevées.

• Périodes de capture

- Moineaux : entre début août et fin octobre 2004 (du 12/08/04 au 30/10/04).
- Pies : - entre fin août et mi-octobre en 2004 (du 23/08/04 au 27/10/04) ;  
- entre mi-mai et fin septembre en 2005 (du 21/05/05 au 29/09/05).

En juillet et août 2005, les captures de pies ont été effectuées par des stagiaires en fin de cursus vétérinaire (Océane Grège, Stéphanie Franco, Claire Manolli). Les critères utilisés pour estimer l'âge des individus capturés au piège se sont basés sur diverses références bibliographiques (Seel 1976, Svensson 1984, Goodwin 1986, Cramp *et al.* 1994, Madge & Burn 1996).

• Méthode de prélèvement

- Les moineaux ont fait l'objet des mêmes prélèvements que les passereaux migrateurs capturés au printemps.

- Pour les pies, le prélèvement de sang a été effectué à la veine alaire ou, de préférence, à la veine jugulaire à l'aide d'une aiguille montée sur une seringue de 1 mL ou 2 mL (et parfois à l'aide de tubes capillaires héparinés). En 2004, seuls un prélèvement de sang et d'ectoparasites ont été réalisés.

- Pendant la campagne de terrain de 2005, les pies ont fait l'objet de prélèvements complémentaires en vue d'une mise en évidence directe du virus : écouvillon buccal écouvillon cloacal et petites plumes en croissance.

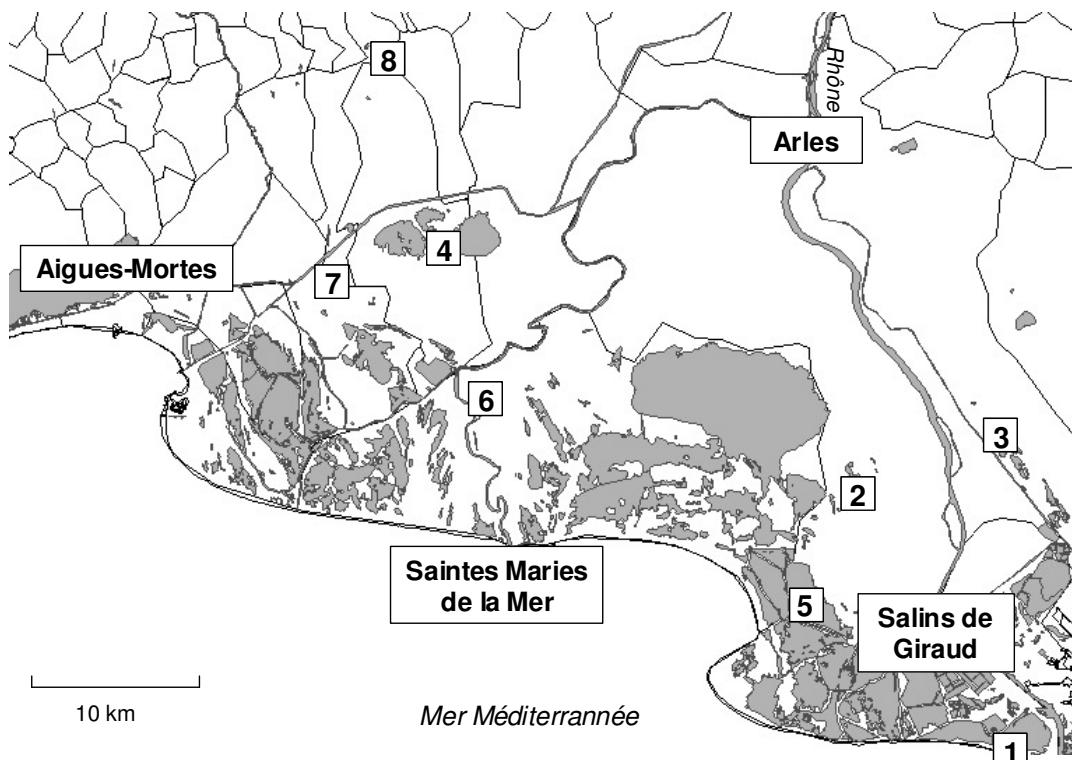
• Traitement des prélèvements

- Campagne de prélèvements de 2004 :

Les prélèvements de sang ont été centrifugés comme indiqué pour les passereaux migrateurs. Les sérums ont été apportés à l'Institut Pasteur (le 21/09/04 et le 02/11/04) puis stockés à -20 °C. Les ectoparasites ont été placés dans de l'alcool à 70 degrés. Deux oiseaux trouvés morts (moineau le 18/10/04 et pie le 21/10/04) ont été conservés au congélateur (environ -10 °C) pendant une quinzaine de jours avant d'être apportés à l'Institut Pasteur le 02/11/04 et congelés à -80 °C.

- Campagne de prélèvements de 2005 :

Les prélèvements de sang et les ectoparasites ont été traités comme indiqué précédemment. Les sérums ont été apportés à l'Institut Pasteur (01/06/05, 19/07/05, 22/08/05 et 03/10/05) et congelés à -20 °C à ces dates. Les écouvillons (cloacaux et buccaux) ont été placés dans un milieu de transport pour virus (Viralpack, Société BIOLYS) et congelés à -20 °C. Ils ont été transportés à l'Institut Pasteur le 03/10/05 en respectant la chaîne du froid et ont été placés en congélateur, également à -20 °C. Les bulbes de plumes ont été conservés dans de l'alcool à 70 degrés à -20 °C. Les tiques ont été identifiées à l'aide d'une clé d'identification des tiques d'Italie (Manilla 1998).



**Figure 5 :** Localisation des principaux sites de capture : 1 – Plage de Piémanson : passereaux migrateurs ; 2 – Station Biologique de la Tour du Valat : moineaux, pies ; 3 – Marais du Vigueirat : moineaux, pies ; 4 – Etangs du Charnier et de Scamandre : hérons garde-bœufs, pies ; 5 – Etang du Fangassier : flamants roses ; 6 – Astouin : pies ; 7 – Domaine de Mahistre : pies ; 8 – Générac : pies.

## 2.2 Méthodes d'analyse au laboratoire

Nous avons tout d'abord mis au point des **techniques sérologiques** adaptées pour analyser les sérums d'oiseaux sauvages. Puis, nous avons testé les sérums prélevés sur le terrain. Enfin, nous avons commencé à traiter les échantillons prélevés pendant l'année 2005 en vue d'une extraction d'ARN et d'une analyse par **biologie moléculaire** (écouvillons, follicules plumeux, ectoparasites, oiseaux morts). En revanche, le travail d'extraction d'ARN, de biologie moléculaire et d'isolement viral sur les échantillons prélevés en 2004 (oiseaux morts et ectoparasites) a été effectué par les techniciennes du CNR (Séverine Murri et Stéphanie Reynard).

Nous décrirons dans les paragraphes qui suivent les techniques qui ont été utilisées ou avec lesquelles des essais ont été pratiqués. Nous aborderons tout d'abord les techniques sérologiques, qui visent à mettre en évidence des anticorps spécifiques du virus WN, puis les méthodes relatives à une mise en évidence directe du virus ou de fragments de génome viral.

### 2.2.1 Sérologie

Les sérums d'oiseaux domestiques sentinelles (poules et canards) prélevés dans le cadre du programme de surveillance du virus WN sont analysés en routine par un test immunoenzymatique *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) indirect mis au point au sein du CNR (Murgue *et al.* 2001b). Puis les échantillons positifs sont confirmés par séroneutralisation en plaque 12 puits (méthode de référence).

Nous avons souhaité procéder de la même manière avec les sérums prélevés sur oiseaux sauvages. Dans un premier temps, nous avons donc évalué la possibilité de tester nos échantillons à l'aide de cette méthode **ELISA indirect**. Celle-ci s'étant avérée adaptée pour certaines espèces mais pas pour d'autres, nous avons ensuite cherché à mettre au point une technique **ELISA par compétition** décrite dans la littérature (Hall *et al.* 1995, Blitvich *et al.* 2003a). Mais les essais réalisés avec cette méthode ont été peu satisfaisants. Nous avons donc préféré tester les sérums d'oiseaux sauvages par une technique de neutralisation. La neutralisation en plaque 12 puits étant lourde à réaliser et nécessitant une grande quantité de sérum (100 à 200  $\mu$ L), nous avons mis au point une technique de **séroneutralisation en plaque 96 puits** (microneutralisation) qui permet de tester simultanément une cinquantaine d'échantillons et n'utiliser qu'une faible quantité de sérum.

Pour les oiseaux prélevés à l'aide d'un tube capillaire hépariné, les analyses ont été réalisées sur **plasma** et non pas sur sérum. Les pies bavardes, pour lesquelles des échantillons de sérum et de plasma étaient disponibles, nous ont permis de vérifier que les techniques utilisées donnaient des résultats équivalents sur plasma et sur sérum.

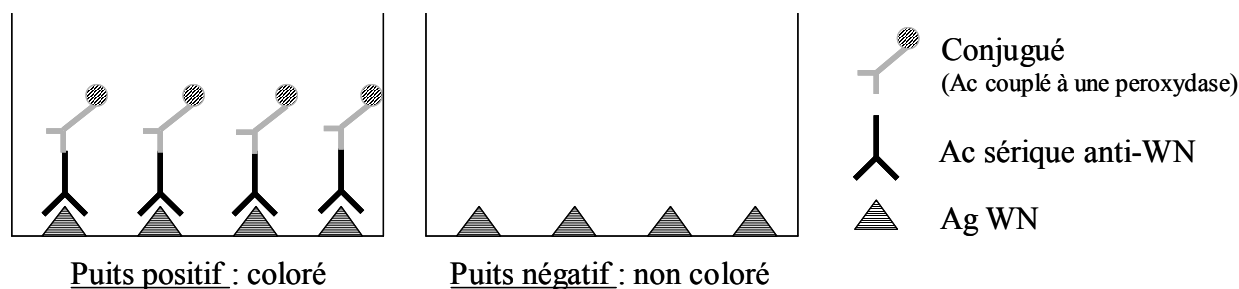
### 2.2.1.1 ELISA indirect

#### • Principe

La technique ELISA est basée sur une réaction de coloration enzymatique. Le principe pour la mise en évidence d'immunoglobulines G (IgG) spécifiques du virus WN est indiqué sur la **Figure 6**. Les étapes sont les suivantes :

- (1) Un antigène (Ag) WN est adsorbé (ou coaté) 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 (Ac) (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) Un conjugué (solution d'anticorps secondaires préalablement liés à une enzyme peroxydase) **capable de reconnaître les IgG de l'espèce testée** est ensuite distribué. Après rinçage, le conjugué n'est présent que dans les puits ayant des complexes Ag-Ac.
- (4) L'ajout d'un substrat, transformé par la peroxydase du conjugué en un produit coloré, permet de révéler les puits contenant ce complexe Ag-Ac-conjugué. La coloration de chaque puits est mesurée par un spectrophotomètre lecteur de plaques ELISA.

La coloration des puits coatés avec l'antigène WN est comparée à celle observée dans des puits coatés avec un antigène négatif afin de détecter une éventuelle fixation non spécifique du sérum. Cet antigène négatif est synthétisé de la même manière que l'antigène WN mais à partir de cellules non infectées.



**Figure 6** : Principe de la technique ELISA indirect.

#### • Test des conjugués

La contrainte de cette méthode ELISA est de disposer d'un conjugué capable de reconnaître les IgG de l'espèce testée.

Pour les oiseaux domestiques, il existe dans le commerce des conjugués **anti-canard** (04-25-06, KPL Europe, Guilford, UK) et **anti-poule** (14-24-06, KPL Europe, Guilford, UK). Un autre conjugué (A140-110P, Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX) a par ailleurs été

récemment mis sur le marché en tant que conjugué **anti-oiseaux** (Ebel *et al.* 2002). Ce conjugué est obtenu par immunisation de chèvres avec des IgG purifiées de Tourterelle domestique *Streptopelia risoria*, Canard de barbarie *Cairina moschata*, Bruant à couronne blanche *Zonotrichia leucophrys* et Poule domestique *Gallus gallus* (Ebel, communication personnelle).

Il est aussi possible, à la place du conjugué, d'utiliser une ascite, c'est-à-dire une solution d'immunoglobulines obtenue à partir d'un animal de laboratoire immunisé par une solution antigénique et inoculé avec des cellules tumorales (hybridome) : l'animal développe une tumeur péritonéale liquide et des immunoglobulines spécifiques de l'antigène inoculé peuvent être obtenues en grande quantité en collectant le liquide intrapéritonéal. Si l'ascite a été produite, par exemple, à partir d'une souris, elle est ensuite reconnue par un conjugué anti-souris. Le CNR disposait d'une **ascite anti-hirondelle** (sans précision sur l'espèce) en provenance de l'Institut Pasteur de Cayenne.

Nous avons évalué la compatibilité de ces différents réactifs avec les immunoglobulines des diverses espèces d'oiseaux sauvages prélevées sur le terrain.

#### Conjugués anti-canard, anti-poule, anti-oiseaux

Dans un premier temps, la reconnaissance des immunoglobulines par les conjugués a été évaluée pour quelques espèces représentant différentes familles d'oiseaux. Les plasmas des espèces à tester et des sérums témoins (homme : contrôle négatif ; poule et canard, contrôles positifs) ont été coatés au centième sur trois plaques ELISA à fort pouvoir d'adsorption (type Maxi-sorp, Nunc, Rochester, NY, USA). Après une nuit d'incubation à +4 °C, le conjugué (selon la plaque : anti-canard, anti-poule ou anti-oiseaux) a été distribué en dilutions successives (1/250 à 1/32000). Puis, après une heure d'incubation, la plaque a été rincée et révélée par ajout de substrat. La comparaison des trois plaques a permis de montrer que, d'une façon générale, les immunoglobulines de toutes les espèces sauvages testées étaient mieux reconnues avec le **conjugué anti-oiseaux** qu'avec les conjugués anti-canard ou anti-poule. Par conséquent, pour les autres espèces, la reconnaissance des immunoglobulines n'a été testée qu'avec le conjugué anti-oiseaux et à partir d'une gamme de dilution plus réduite (1/250 à 1/4000). Les résultats relatifs aux **27 espèces testées** sont indiqués dans le **tableau II**. Seules six espèces ont été reconnues de façon satisfaisante (densité optique supérieure ou égale à la moitié de celle des témoins positifs) : la **Pie bavarde**, l'**Hirondelle rustique**, le **Moineau domestique**, le **Moineau friquet**, le **Rouge-gorge** et le **Pouillot véloce**.

Des essais, visant à comparer les résultats obtenus avec le conjugué anti-oiseaux et avec les conjugués anti-poule et anti-canard, ont été pratiqués sur des témoins poules et canards positifs (possédant des IgG spécifiques du virus WN) et négatifs (ne possédant pas d'IgG spécifiques du virus WN). Les résultats du test ELISA indirect avec le conjugué anti-oiseaux ont été parfaitement concordants avec ceux obtenus avec les autres conjugués. Par

conséquent, les plasmas des six espèces d'oiseaux sauvages ayant des immunoglobulines reconnues par le conjugué anti-oiseaux ont été testés par méthode ELISA indirect avec ce conjugué (protocole en *annexe 2*).

**Tableau II** : Liste des espèces dont le plasma a été testé avec le conjugué anti-oiseaux (AO). Le signe + indique que les immunoglobulines de l'espèce étaient reconnues par le conjugué (densité optique supérieure ou égale à la moitié de celle observée pour les témoins positifs) et le signe – qu'elles ne l'étaient pas (densité optique inférieure à la moitié de celle observée pour les témoins positifs).

Ordre	Famille	Espèce	Espèce (latin)	AO
Ciconiiformes	Ardéidés	Héron garde-bœufs	<i>Bubulcus ibis</i>	-
Coraciformes	Upupidés	Huppe fasciée	<i>Upupa epops</i>	-
Cuculiformes	Cuculidés	Coucou gris	<i>Cuculus canorus</i>	-
Passériformes	<b>Corvidés</b>	<b>Pie bavarde</b>	<b><i>Pica pica</i></b>	+
	<b>Hirundinidés</b>	<b>Hirondelle rustique</b>	<b><i>Hirundo rustica</i></b>	+
	Laniidés	Pie-grièche à tête rousse	<i>Lanius senator</i>	-
	Muscicapidés	Gobe-mouche gris	<i>Muscicapa striata</i>	-
		Gobe-mouche noir	<i>Ficedula hypoleuca</i>	-
	<b>Passéridés</b>	<b>Moineau domestique</b>	<b><i>Passer domesticus</i></b>	+
		<b>Moineau friquet</b>	<b><i>Passer montanus</i></b>	+
	Prunellidés	Accenteur mouchet	<i>Prunella modularis</i>	-
	Sylviidés	Bouscarle de Cetti	<i>Cettia cetti</i>	-
		Fauvette à tête noire	<i>Sylvia atricapilla</i>	-
		Fauvette des jardins	<i>Sylvia borin</i>	-
		Fauvette grisette	<i>Sylvia communis</i>	-
		Fauvette passerinette	<i>Sylvia cantillans</i>	-
		Hypolaïs polyglotte	<i>Hippolais polyglotta</i>	-
		Pouillot fitis	<i>Phylloscopus trochilus</i>	-
		Pouillot siffleur	<i>Phylloscopus sibilatrix</i>	-
		<b>Pouillot véloce</b>	<b><i>Phylloscopus collybita</i></b>	+
	Turdidés	Rossignol philomèle	<i>Luscinia megarhynchos</i>	-
		<b>Rouge-gorge</b>	<b><i>Erithacus rubecula</i></b>	+
		Rouge-queue à front blanc	<i>Phoenicurus phoenicurus</i>	-
		Rouge-queue noir	<i>Phoenicurus ochruros</i>	-
		Rousserolle turdoïde	<i>Acrocephalus arundinaceus</i>	-
		Traquet motteux	<i>Oenanthe oenanthe</i>	-
Phoenicoptérimorphes	Phoenicopteridés	Flamant rose	<i>Phoenicopterus roseus</i>	-

### Ascite d'hirondelle

Le CNR était en possession d'une ascite d'hirondelle encore non évaluée, en provenance de l'Institut Pasteur de Cayenne, dont la technique de fabrication n'était pas documentée. La reconnaissance des immunoglobulines d'oiseaux a été testée avec cette ascite selon la méthode décrite précédemment, mais avec une étape supplémentaire : un conjugué anti-souris était distribué après une heure d'incubation de l'ascite d'hirondelle. Un plasma d'Hirondelle rustique servait de témoin positif. Les immunoglobulines de toutes les espèces d'oiseaux sauvages testées ont été reconnues par l'ascite d'hirondelle. En revanche, l'ascite ne se fixait ni sur sérum humain ni sur sérum de canard domestique. Les sérums de poule domestique étant reconnus, nous avons décidé d'utiliser des témoins poules pour valider le test ELISA. Les essais effectués n'ont pas été satisfaisants : aucun signal n'était détecté, y compris pour le témoin positif.



Les premiers tests effectués nous ont démontré que l'ascite est capable de se fixer sur certains éléments présents dans le plasma des oiseaux lorsque ceux-ci étaient coatés sur une plaque ELISA. Les immunoglobulines d'oiseaux semblaient donc être reconnues. Mais il s'est avéré que les IgG spécifiques du virus WN ne l'étaient pas. Nous pouvons suggérer deux explications : soit les éléments du plasma reconnus après coating direct sur la plaque étaient autre chose que des immunoglobulines ; soit l'ascite ne se fixait que sur certains types d'immunoglobulines mais pas sur d'autres (en l'occurrence, pas sur les IgG spécifiques du virus WN).

L'ascite anti-hirondelle n'a donc pas été utilisée pour analyser nos plasmas d'oiseaux en sérologie WN.

- Application

Les plasmas de **Pie bavarde**, **Hirondelle rustique**, **Moineau domestique**, **Moineau friquet**, **Rouge-gorge** et **Pouillot véloce** ont été testés par méthode ELISA indirect avec le conjugué anti-oiseaux (protocole en *annexe 2*). La quantité de plasma nécessaire pour effectuer ce test étant très faible (3  $\mu$ L), tous les positifs ont pu être confirmés par la technique de neutralisation.

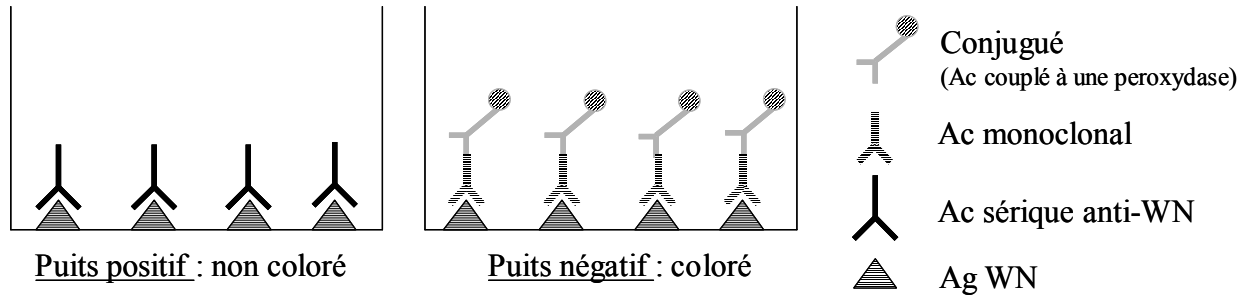
### 2.2.1.2 ELISA par compétition

- 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 (*figure 7*) :

- (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.



**Figure 7** : Principe de la technique ELISA par compétition.

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 :

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

Où **S** : densité optique (DO) du sérum testé sur Ag WN,  
**BF** : bruit de fond correspondant, **ST<sub>i</sub>** : DO des sérums témoins testés sur Ag WN, **BF<sub>i</sub>** : bruit de fond des sérums témoins.

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

• Test des anticorps monoclonaux

Différents anticorps monoclonaux ont été récemment testés pour mettre au point des tests sérologiques adaptés à la détection d'anticorps spécifiques du virus WN dans les sérums d'oiseaux sauvages (Blitvich *et al.* 2003a). Nous avons travaillé sur deux de ces anticorps monoclonaux : le **3.1112G** (isotype IgM, Chemicon mab 8152) détectant un épitope de la protéine non structurale NS1 et le **3.91D** (isotype IgG<sub>3</sub>, Chemicon mab 8151) détectant un épitope de la protéine d'enveloppe.

Dans un premier temps, nous avons fait plusieurs manipulations pour déterminer les dilutions optimales d'utilisation de chacun des anticorps monoclonaux et du conjugué anti-souris couplé à la peroxydase (anti-IgM pour le 3.1112G et anti-IgG pour le 3.91D). Nous avons ensuite comparé les résultats obtenus par technique de compétition avec ceux de la méthode ELISA indirect. Les échantillons devant être **dilués au dixième** (Hall *et al.* 1995),

une très grande quantité de témoins a été consommée à l'occasion du calibrage de ces tests. Nous avons fait des essais avec une dilution au vingtième mais le pourcentage d'inhibition s'en trouvait fortement diminué (ce qui est peu étonnant puisque le principe du test repose sur la saturation des épitopes par les anticorps contenus dans le sérum). Plusieurs analyses de témoins positifs avec l'anticorps monoclonal 3.91D ont montré que le pourcentage d'inhibition obtenu était inférieur à 35%. Nous avons donc décidé de n'utiliser ensuite que le **3.1112G**. Nous avons vérifié avec cet anticorps 3.1112G qu'il n'y avait pas de réaction croisée avec deux autres virus du genre *Flavivirus* : le virus de l'Encéphalite à tiques et le virus de la Dengue.

Des premiers essais ont été réalisés à partir de prélèvements effectués sur des hérons garde-bœufs, des flamants roses et des poules domestiques (protocole en *annexe 3*) :

- D'une façon générale, nous avons constaté que les résultats pour les échantillons négatifs étaient très variables. La densité optique des témoins négatifs étant utilisée pour calculer le pourcentage d'inhibition des autres sérums, le choix des témoins pouvait modifier de façon importante les pourcentages d'inhibition. Le choix d'une valeur seuil fixe semblait donc peu approprié.
- Pour les hérons garde-bœufs, certains plasmas présentaient des pourcentages d'inhibition de l'ordre de 35-40%. Parmi ces plasmas, deux ont été re-testés et sont apparus clairement négatifs. Un plasma présentant un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 40% ne pouvait donc pas être considéré comme positif.
- Pour les flamants roses, de forts pourcentages d'inhibition ont été observés pour certains échantillons et n'ont pas été confirmés ensuite. Le sang n'ayant pas été centrifugé, l'incohérence de ces résultats est peut-être due au fait que les échantillons étaient hémolysés.
- Plusieurs sérums de poule nous ont été gracieusement envoyés par un vétérinaire praticien de Camargue. Ces sérums ont été prélevés dans un élevage où l'existence de poules positives en anticorps spécifiques du virus WN était connue (élevage utilisé dans le cadre du programme national de surveillance). Pour éviter les biais d'interprétation, ces échantillons ont été traités en aveugle par la technique ELISA par compétition puis par la technique ELISA classique. Sur les vingt poules prélevées, six étaient positives en ELISA indirect. Toutes les poules négatives ont présenté des pourcentages d'inhibition inférieurs à 25%. En revanche, seule une poule positive a présenté un pourcentage d'inhibition élevé (76%). Pour trois autres, les résultats pouvaient être considérés comme douteux car les pourcentages d'inhibition étaient respectivement 47%, 42% et 31%. Les résultats des deux dernières poules étaient négatifs.

Ces essais nous ont révélé que la méthode ELISA par compétition, encore mal standardisée, n'était pas répétitive et donc pas fiable. La dilution choisie pour l'anticorps

monoclonal avait peut-être besoin d'être ajustée (nous avons volontairement choisi une dilution faible pour éviter une compétition avec les anticorps sériques mais il semble que les laboratoires qui utilisent cette technique le diluent beaucoup moins). D'autre part, l'antigène utilisé n'était peut-être pas adapté pour cette méthode. En effet, nous avons utilisé l'antigène produit pour les techniques ELISA indirect : après préparation, cet antigène n'est pas dosé précisément mais seulement évalué par comparaison avec un lot précédent.

Nous avons contacté une équipe américaine utilisant cette technique (laboratoire de J. Novak, Illinois). Le Dr. Brendon Heffron nous a envoyé ses protocoles et nous a expliqué que, dans leur laboratoire, chaque sérum était testé simultanément pour trois anticorps monoclonaux réagissant avec des flavivirus (3.1112G, 2B2, 6B6C-1). Parmi ces anticorps, seul le 3.1112G est spécifique du virus WN mais, pour eux, **un sérum n'est considéré positif que si une réaction est observée avec les trois anticorps monoclonaux**. La quantité de sérum nécessaire pour tester un échantillon est donc multipliée par trois.

A ce stade, nous devions décider soit de poursuivre la mise au point de cette technique (commande des anticorps monoclonaux 2B2 et 6B6C-1), soit d'utiliser une technique de séroneutralisation. Nous avons fait le choix d'arrêter les essais utilisant la technique ELISA par compétition pour les raisons suivantes :

- le temps nécessaire à la mise au point de cette technique pouvait encore être long, surtout si l'antigène s'avérait inadapté, et notre objectif premier était de tester rapidement les sérums prélevés sur le terrain ;
- le délai de réception des anticorps monoclonaux risquait d'être important (plusieurs mois) ;
- nous avons déjà utilisé une très grande quantité de témoins et la mise au point de cette technique en consomme énormément ;
- la quantité de sérum nécessaire pour chaque échantillon (20 $\mu$ L multiplié par trois) était élevée alors que nous disposions de peu de matériel. En effet, le volume de sang prélevé sur les oiseaux était volontairement faible afin de ne pas compromettre leur survie, en particulier pour les migrateurs.

- Application

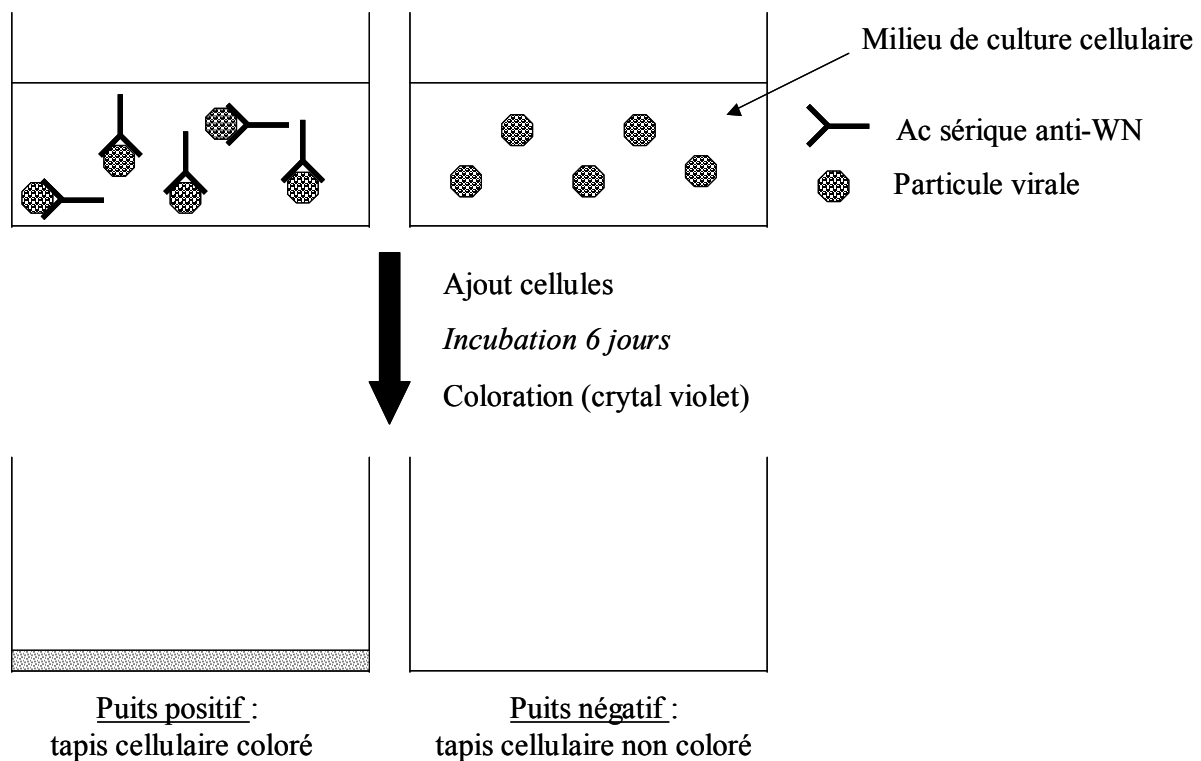
Cette technique **n'a pas été utilisée** pour tester nos sérums. Un travail de mise au point est encore nécessaire avant de pouvoir l'appliquer.

### 2.2.1.3 Séroneutralisation en plaque 96 puits

La méthode de référence en sérologie WN est la neutralisation en plaque 12 puits. Cette technique est lourde et n'est pas adaptée pour tester une grande quantité de sérums simultanément. Nous avons utilisé une technique en plaque 96 puits (microneutralisation) plus adaptée à la réalisation d'un screening et moins consommatrice de sérum.

- Principe

Le principe de la séroneutralisation est d'inhiber le pouvoir infectieux du virus par des anticorps spécifiques. Le pouvoir infectieux est révélé en mettant le virus au contact de cellules : après quelques jours, les cellules infectées sont lysées. En revanche, en présence d'anticorps spécifiques, le virus ne peut pas infecter les cellules et le tapis cellulaire reste intact. L'état du tapis cellulaire 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 cellulaire est intact, et transparents s'il a été lysé par le virus (*figure 8*).



**Figure 8** : Principe de la technique de séroneutralisation en plaque 96 puits.

En pratique, une quantité connue de virus, appelée **titre viral**, est mise en contact avec un même sérum à différentes dilutions (1/20 à 1/1280). S'il y a beaucoup d'anticorps spécifiques dans le sérum, l'effet protecteur persistera même si le sérum est dilué. En revanche, s'il y a peu d'anticorps ou si ceux-ci sont peu spécifiques, il suffira d'une faible dilution du sérum pour observer l'effet lytique du virus sur les cellules. Pour chaque sérum, on évalue donc à

partir de quelle dilution il existe un effet de lyse : la dernière dilution pour laquelle aucune lyse n'a été observée s'appelle le **titre en anticorps** du sérum. Nous avons considéré qu'un échantillon était positif si son titre était **supérieur ou égal à 80**.

- Méthode de la TCID<sub>50</sub>

La technique de séroneutralisation en plaque 96 puits a été adaptée à partir de protocoles utilisés pour un virus de la famille des Paramyxoviridae, le virus Nipah (protocole en *annexe 4*). Elle utilise la notion de titre en TCID<sub>50</sub> (50% *Tissue Culture Infective Dose*) qui correspond à la dilution de virus pour laquelle 50% des puits présentent une lyse cellulaire. En théorie, le virus distribué sur les sérums à tester est dilué à 100 TCID<sub>50</sub>. Pour chaque manipulation, le titre exact en TCID<sub>50</sub> de la solution virale utilisée est calculé par la formule simplifiée de Spearman-Kärber (exemple en *annexe 5*) pour s'assurer que la quantité distribuée était bien proche de 100 TCID<sub>50</sub> : le test de séroneutralisation n'est validé que si le titre viral déterminé est compris entre 50 et 200 TCID<sub>50</sub>. Quand le titre viral est supérieur à 200 TCID<sub>50</sub>, les sérums sont à nouveau testés (risque de faux négatifs). Si, au contraire, le titre est inférieur à 50 TCID<sub>50</sub>, seuls les sérums neutralisants sont à nouveau testés (risque de faux positifs). Pour deux sérums, il n'a pas été possible de renouveler la manipulation par manque de matériel mais, le titre observé étant comparable à celui du témoin positif, ils ont quand même été considérés positifs.

- Application

Les échantillons de **toutes les espèces** ont été testés par cette technique de neutralisation en plaque 96 puits, à l'exception : (1) des sérums de pies et de moineaux, pour lesquels seuls les positifs en ELISA indirect ont été confirmés en neutralisation ; (2) des sérums d'oiseaux migrateurs testés en ELISA indirect pour lesquels il ne restait pas suffisamment de sérum. Les échantillons de sang prélevés sur les flamants roses n'ont pas pu être traités car ils avaient un effet toxique sur les cellules.

Les intervalles de confiance autour des valeurs de séroprévalence ont été calculés en utilisant la **loi binomiale**. La comparaison du nombre d'individus séropositifs entre classes d'oiseaux a été effectuée par le **test exact de Fisher**.

## 2.2.2 Biologie moléculaire et virologie

Une recherche directe du virus WN a été réalisée sur différents prélèvements (ectoparasites, cerveau d'oiseaux morts, écouvillons oraux ou cloacaux, bulbes de plumes en croissance). Les prélèvements ont tout d'abord été testés en **biologie moléculaire** (recherche du génome viral). Un **isolement** a été effectué à partir des échantillons positifs. Le génome de l'isolat a été **complètement séquencé**, aligné avec les souches déjà décrites dans la littérature, et analysé.

Contrairement aux techniques sérologiques, les techniques utilisées pour mettre en évidence directement le virus WN ou son génome sont les mêmes quelles que soient les espèces dont sont issues les échantillons. Par conséquent, les techniques que nous avons utilisées sont les **techniques classiques de virologie**.

### 2.2.2.1 Amplification d'un fragment de génome viral

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est une technique extrêmement sensible qui permet d'amplifier spécifiquement un fragment d'ADN. Le virus WN étant un virus à ARN, son génome doit être transcrit en ADN avant d'être amplifié (RT-PCR pour *Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*).

- Extraction d'ARN

Selon la nature des prélèvements, deux méthodes ont été utilisées : (1) l'extraction **sur colonne** (QIAamp® Viral RNA Mini Kit, QIAGEN, Valencia, Calif.) pour les surnageants de prélèvements cloacaux et buccaux ; (2) l'extraction **en trizol** pour les ectoparasites, les broyats de cerveau et les bulbes de plumes. L'ARN extrait a ensuite été conservé à -80 °C.

- RT-PCR et Nested-PCR

L'ARN viral présent dans l'extrait a été amplifié par **RT-PCR** en utilisant des primers spécifiques d'une zone du génome du virus WN : les primers Wn 233 et Wn 640c (Lanciotti *et al.* 2000) (cf. **annexe 6**). Pour augmenter la sensibilité, les produits de PCR ont été réamplifiés (**Nested-PCR**) par deux autres primers s'hybridant à l'intérieur du premier fragment amplifié : les primers Wn 287 et Wn 390 (cf. **annexe 6**). Cette technique est extrêmement sensible mais le risque de contamination est élevé. Les échantillons positifs ont donc été confirmés par une seconde analyse en RT-PCR et Nested-PCR.

### 2.2.2.2 Isolement viral

L'isolement viral a été réalisé à partir de deux biopsies de cerveau (prélevées respectivement sur un Moineau domestique et une Pie bavarde) sur deux lignées cellulaires :

des cellules de moustique (C6/36) et des cellules de mammifères (Vero E6). Ce travail a été effectué par Stéphanie Reynard, technicienne au CNR.

### 2.2.2.3 Séquençage et phylogénie

Une fois le virus isolé, une grande quantité d'ARN viral peut être extraite à partir du surnageant de cultures cellulaires infectées. Il est alors possible d'amplifier la totalité du génome viral (environ 11000 paires de bases) afin de le séquencer et de caractériser la souche trouvée.

- Amplification et séquençage du génome

Le génome viral des deux isolats obtenus sur oiseaux a été totalement amplifié par Stéphanie Reynard. Le principe est d'**amplifier** successivement par RT-PCR de petits fragments de génome (n=24) se chevauchant (liste des primers en *annexe 7*). Ces fragments ont été envoyés pour **séquençage** à une société spécialisée (Génome Express®). Les fragments obtenus ont ensuite été **alignés** et **analysés** pour reconstituer le génome complet. Ce travail a été effectué à l'aide du logiciel BioEdit (version 7.4.0.1, BioEdit Sequence Alignment Editor, 1997-2005, Tom Hall).

- Construction d'un arbre phylogénétique

Le génome complet a été aligné avec celui de génomes publiés dans GenBank (banque internationale de données qui rassemble les séquences d'acides nucléiques publiées) en utilisant le logiciel ClustalW1.7 (Thompson *et al.* 1994). L'objectif était de déterminer la position phylogénétique de nos isolats par rapport à d'autres virus proches et déjà décrits dans la littérature. La représentation graphique correspondante est appelée **arbre phylogénétique**.

La comparaison des séquences les unes aux autres est basée sur le calcul d'un pourcentage de similitude dont les résultats sont regroupés dans une matrice de distances. Nous avons utilisé le **modèle de Kimura (K2P)** avec la **correction gamma**. Ce modèle tient compte du fait que la probabilité de mutations n'est pas la même selon la nature des bases qui constituent la molécule d'acide nucléique.

L'arbre phylogénétique a été construit à partir de la matrice des distances avec la méthode de **Neighbor-Joining** à l'aide du logiciel MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*, version 2.1). Chaque séquence est représentée par une branche de l'arbre dont la longueur est telle que la distance entre deux séquences de l'arbre soit la plus proche possible de la distance phylogénétique calculée entre ces deux séquences.



### 3 Résultats et discussions

Deux articles, présentant une partie des résultats obtenus au cours de ces investigations de terrain et de laboratoire, sont en préparation et figurent à la fin de ce manuscrit. Dans cette partie, nous replacerons ces articles dans leur contexte mais les résultats correspondants ne seront pas détaillés.

#### 3.1 Séroprévalence chez les oiseaux migrateurs en provenance d’Afrique sub-saharienne

##### 3.1.1 Article 3

*En préparation*

Jourdain E., Zeller H., Sabatier P., Murri S., Kayser Y, Gauthier-Clerc M.

***West Nile virus serosurvey on wild birds migrating from sub-Saharan Africa into Western Europe***

*Cet article présente les résultats des investigations effectuées sur les passereaux migrateurs prélevés au printemps 2004. Toutes espèces confondues, la prévalence sérologique est comprise entre 1,6 et 5,7%. Par ailleurs, près de 2% des oiseaux prélevés sont porteurs de tiques dures. Les différentes modalités possibles d’introduction du virus WN en Camargue par les oiseaux migrateurs sont discutées.*

##### 3.1.2 Autres résultats

La majorité des tiques qui ont pu être identifiées étaient des nymphes du genre *Ixodes* (**tableau III**). Seules quatre tiques ont pu être amenées vivantes au CNR pour être congelées à -80 °C. Il s’agit de nymphes prélevées sur deux rouges-gorges. Ces tiques sont négatives pour le virus WN.

**Tableau III** : Liste des tiques prélevées sur les oiseaux migrateurs.

Espèce	Identifiant	Nombre de tiques	Stade	Identification	Observation	
Fauvette à tête noire	<i>Sylvia atricapilla</i>	4928	1	nymphe	<i>Ixodes</i> sp.	
Gobemouche noir	<i>Ficedula hypoleuca</i>	4790	1	nymphe	?	présence d'ocelles
		M61	3	nymphes	?	présence d'ocelles
Pouillot fitis	<i>Phylloscopus trochilus</i>	4806	1	nymphe	<i>Ixodes</i> sp.	
Rossignol philomèle	<i>Luscinia megarhynchos</i>	4743	1	larve	<i>Ixodes</i> sp.	
		4953	1	nymphe	<i>Ixodes</i> sp.	
Rougegorge	<i>Erithacus rubecula</i>	4698	2	1 nymphe + 1 larve	<i>Ixodes</i> sp.	
		4773	2	nymphes	?	
		4785	6	5 nymphes + 1 larve	<i>Ixodes</i> sp.	
		4844	1	nymphe	<i>Ixodes</i> sp.	
Rougequeue à front blanc	<i>Phoenicurus phoenicurus</i>	4653	2	nymphes	?	présence d'ocelles
		4702	1	larve ou nymphe	?	présence d'ocelles

## **3.2 Séroprévalence chez les poussins d'une espèce coloniale, le Héron garde-bœufs**

Au total, **201 échantillons** de plasma de poussins de héron garde-bœufs ont été testés par la technique de neutralisation en plaque 96 puits. Pour 16 échantillons, les résultats n'ont pas pu être interprétés en raison d'une activité toxique du plasma sur les cellules. Sur les 187 plasmas restants, **deux présentaient un titre supérieur à 80** en séroneutralisation. Ces deux poussins ont été prélevés dans deux colonies voisines, à deux dates distinctes, sur le site des étangs de Charnier et Scamandre. La prévalence observée pour les poussins de hérons garde-bœufs est 1,1% [0,1-3,8]. Cette valeur est très inférieure à celle observée lors d'enquêtes épidémiologiques effectuées sur des poussins d'Ardéidés dans d'autres régions du monde (Russie, Inde, Israël, Etats-Unis) (Berezin 1971, Rodrigues *et al.* 1981, Jamgaonkar *et al.* 2003, Mumcuoglu *et al.* 2005, Reisen *et al.* 2005b).

Etant donné qu'aucune recherche directe du virus n'a été effectuée sur nos prélèvements, il n'est pas possible d'exclure le fait que le virus a peut-être circulé chez les jeunes poussins sans que des anticorps spécifiques ne soient synthétisés. Toutefois, les résultats obtenus lors de l'infection expérimentale de hérons garde-bœufs adultes (Work *et al.* 1955) ou âgés de 2-3 semaines (Reisen *et al.* 2005b) semblent indiquer que le titre viral développé chez cette espèce après infection par le virus WN est peu élevé.

Les résultats de nos investigations ne sont donc pas en faveur d'un rôle majeur des poussins de hérons garde-bœufs dans l'amplification du virus WN en Camargue. En outre, il est fort probable que les anticorps détectés soient d'origine maternelle (Reisen *et al.* 2005b). Les femelles ont pu être exposées au virus WN en Camargue ou dans des zones d'hivernage localisées plus au sud, par exemple en Espagne ou en Afrique du nord (Hafner *et al.* 2004).

### **3.3 Séroprévalence et isolement viral chez les oiseaux sédentaires en période épizootique – Phylogénie sur génome complet**

#### **3.3.1 Article 4**

*En révision : revue Vector Borne and Zoonotic Diseases*

Jourdain E., Schuffenecker I., Korimbocus J. Reynard S., Murri S., Kayser Y, Gauthier-Clerc M., Sabatier P., Zeller H.

***West Nile virus in wild resident birds, southern France, 2004***

*Cet article expose les résultats des investigations effectuées sur les pies et les moineaux prélevés pendant l'année 2004. Sur un échantillon de 196 moineaux et 32 pies, nous avons obtenu respectivement 1 et 4 individus séropositifs. De plus, deux isolats d'une même souche virale, obtenus à partir du cerveau d'une pie bavarde et d'un moineau domestique, ont été totalement séquencés. L'analyse phylogénétique sur génome complet révèle que ce virus est proche des souches précédemment isolées en Europe méditerranéenne et en Afrique du Nord. La discussion porte sur le rôle possible de ces passereaux sédentaires et fréquents à proximité des écuries dans l'amplification et la transmission aux chevaux du virus WN, et sur la nécessité de mieux évaluer la pathogénicité de ce virus pour les oiseaux de Camargue.*

#### **3.3.2 Autres résultats**

Un **pou mallophage**, prélevé sur la pie ayant permis l'isolement du virus WN, s'est avéré **positif en Nested-PCR**.

Aucune histopathologie n'a été effectuée sur cette pie donc la cause exacte de sa mort ne peut être affirmée. Toutefois, le virus WN ayant pu être isolé à partir de son cerveau malgré des conditions de conservation non optimales (congélation à -80 °C douze jours seulement après collecte sur le terrain), cette pie était très probablement en **phase aiguë d'infection** par le virus WN. On peut donc supposer qu'elle présentait une virémie élevée. De ce fait, on peut s'attendre à retrouver des antigènes viraux chez les ectoparasites ayant ingéré le sang de cette pie.

Le pou mallophage n'a pas été identifié en terme d'espèce. La plupart des mallophages se nourrissent de fragments de plumes et de diverses **productions épithéliales** mais certaines espèces **s'imbibent volontiers de sang** si elles en ont l'opportunité, par exemple si l'oiseau qui leur sert d'hôte est blessé (Richards & Davies 1960). La pie en question ayant été capturée dans une trappe à corvidé, elle pouvait présenter quelques lésions (notamment au niveau du bec) liées à ses tentatives de fuite. Il est donc probable que ce pou mallophage ait été

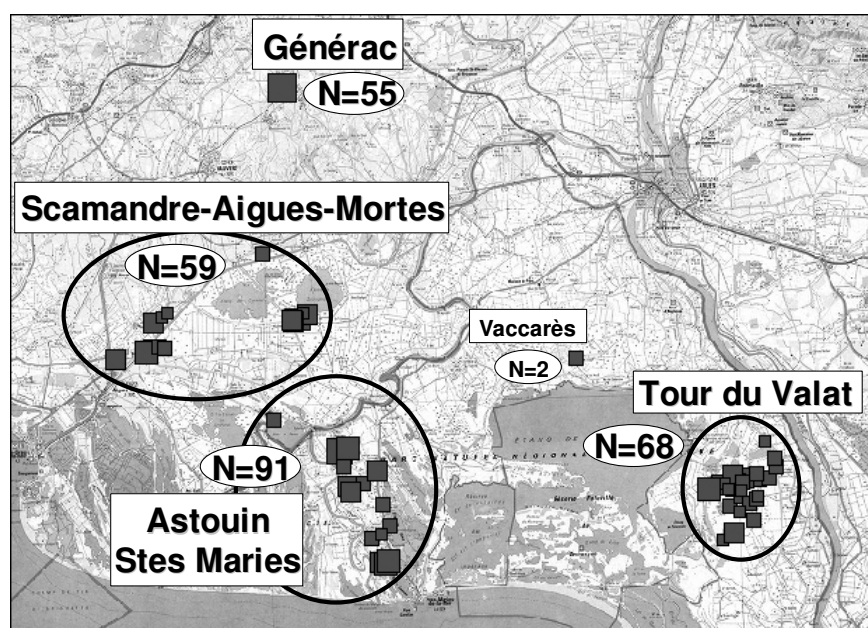
contaminé à partir du sang de la pie en phase de virémie. Toutefois, la détection de virus en quantité importante dans le tissu cutané (incluant du sang et des follicules plumeux) laisse également suspecter une possible contamination à partir de la peau (Banet-Noach *et al.* 2003b, Docherty *et al.* 2004).

### 3.4 Séroprévalence et excrétion du virus chez les oiseaux sédentaires en période post-épizootique

La circulation du virus WN en période post-épizootique a été étudiée chez la **Pie bavarde** pendant l'année 2005.

#### 3.4.1 Description de l'échantillon

Au total, **275 pies** ont été capturées et prélevées, représentant un nombre total de **339 prélèvements**. La répartition par site est indiquée sur la **figure 9** et par âge dans le **tableau IV**. La différence entre pies de première et deuxième année n'ayant pas toujours pu être clairement établie, nous avons regroupé les individus en une classe 1<sup>ère</sup> – 2<sup>ème</sup> années.



**Figure 9** : Localisation des captures de pies bavardes.

**Tableau IV** : Description de l'échantillon en terme de site de capture et d'âge. Les classes d'âge sont les suivantes : poussin au nid, individu volant avec tous les critères de pies de première année, individu volant avec certains critères de pies de première année, individu avec critères de pie adulte.

Age	Jeune			Adulte	Total
	Poussin	1 <sup>ère</sup>	1 <sup>ère</sup> ou 2 <sup>ème</sup>		
Stes Maries - Astouin	2	9	50	34	91
Tour du Valat	20	6	25	17	68
Scamandre - Aigues-Mortes	0	5	26	24	59
Générac	0	33	21	1	55
Vaccarès	0	0	1	1	2
<b>Total</b>	<b>22</b>	<b>53</b>	<b>123</b>	<b>77</b>	<b>275</b>

## 3.4.2 Résultats sérologiques

### 3.4.2.1 Séroprévalence

Sur les 339 prélèvements testés en ELISA indirect, 14 considérés comme positifs et 24 comme faiblement positifs ont été ensuite testés par la technique de neutralisation en plaque 96 puits. Dix des quatorze échantillons considérés positifs en ELISA présentent un titre supérieur ou égal à 80 en neutralisation et quatre un titre inférieur (20 ou 40). Tous les échantillons considérés faiblement positifs avec la méthode ELISA présentent un titre en neutralisation inférieur à 80. Pour la suite, nous n'exploiterons que les résultats obtenus en neutralisation, l'ELISA ayant seulement permis d'effectuer un premier screening.

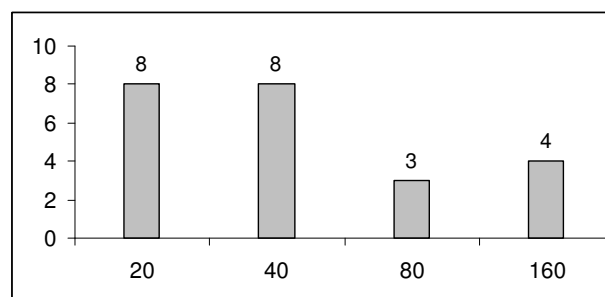
Parmi les 275 pies testées, neuf présentent un titre en séroneutralisation supérieur ou égal à 80. Il s'agit uniquement d'individus **adultes**, capturés dans trois sites : « Tour du Valat », « Scamandre – Aigues-Mortes » et « Astouin – S<sup>tes</sup> Maries de la Mer ». La différence observée entre les pies adultes (n=85) et les jeunes pies (poussins exclus, n=176) est significative (test exact de Fisher,  $p < 0,001$ ). La distribution par site des pies adultes positives est indiquée dans le **tableau V**. A l'échelle de la Camargue (tous sites confondus), la séroprévalence est estimée à **11,8%** [5,6-21,3] chez les pies adultes alors qu'elle est **inférieure à 2,1%** chez les jeunes pies.

**Tableau V** : Séroprévalence observée chez les pies adultes par site de capture.

Pies adultes	Positives	Prélevées	Prévalence (%)
Stes Maries - Astouin	6	34	17,6 [6,8-34,5]
Tour du Valat	1	17	5,9 [0,2-28,7]
Scamandre - Aigues-Mortes	2	24	8,3 [1,0-27,0]
Générac	0	1	0,0 [0,0-97,5]
<b>Total</b>	<b>9</b>	<b>76</b>	<b>11,8 [5,6-21,3]</b>

### 3.4.2.2 Distribution des titres sérologiques

Seuls les individus capturés une seule fois et présentant un titre supérieur ou égal à 20 en séroneutralisation sont considérés (n=23). La distribution des titres observés est présentée dans la **figure 10**. Seize individus présentent un titre inférieur à 80. Il s'agit d'adultes, à l'exception d'une pie de première ou deuxième année prélevée mi-juillet sur le site de la Tour du Valat.



**Figure 10** : Distribution des titres observés (uniquement pies capturées une seule fois).

### 3.4.2.3 Recaptures

Le nombre de pies prélevées plus d'une fois s'élève à 51 (avec n=275, soit un peu moins d'une pie sur cinq). Parmi ces pies, trois ont été gardées comme appelants et prélevées à nouveau avant d'être relâchées. Au total, 39 pies ont été prélevées deux fois, 11 ont été prélevées trois fois, et 1 a été prélevée quatre fois.

Six pies capturées plusieurs fois présentent des anticorps spécifiques du virus WN. Le résultat en fonction du temps de chacun des tests effectués en séroneutralisation est indiqué dans le **tableau VI**. Nous avons indiqué les résultats de la pie FA16812, bien que le titre ne dépasse pas 20, car il s'agit d'une jeune pie ayant initialement un titre inférieur à 20. Seule la pie FA18887 présente un titre supérieur à 80 à deux reprises, début juillet et début août. Les autres ont un titre modéré (20, 40 ou 80) pouvant traduire une infection ancienne, datant notamment de 2004 (année épizootique).

**Tableau VI** : Résultats sérologiques, en fonction du temps, des pies re-capturées ayant un titre supérieur ou égal à 20.

Bague	Age	Juillet			Août				Septembre				
		11 au 15	18 au 22	25 au 29	1 au 5	8 au 12	5 au 19	22 au 26	29 au 2	5 au 9	12 au 16	10 au 23	26 au 30
FA16812	1 ou 2	<20			20								
FA18887	Adulte	160				320							
FA18920	Adulte				40	40		20					
FA18924	1 ou 2				20	40							
FA16610	Adulte										20	40	
FA16617	Adulte										80	40	

### 3.4.3 Amplification du génome du virus West Nile

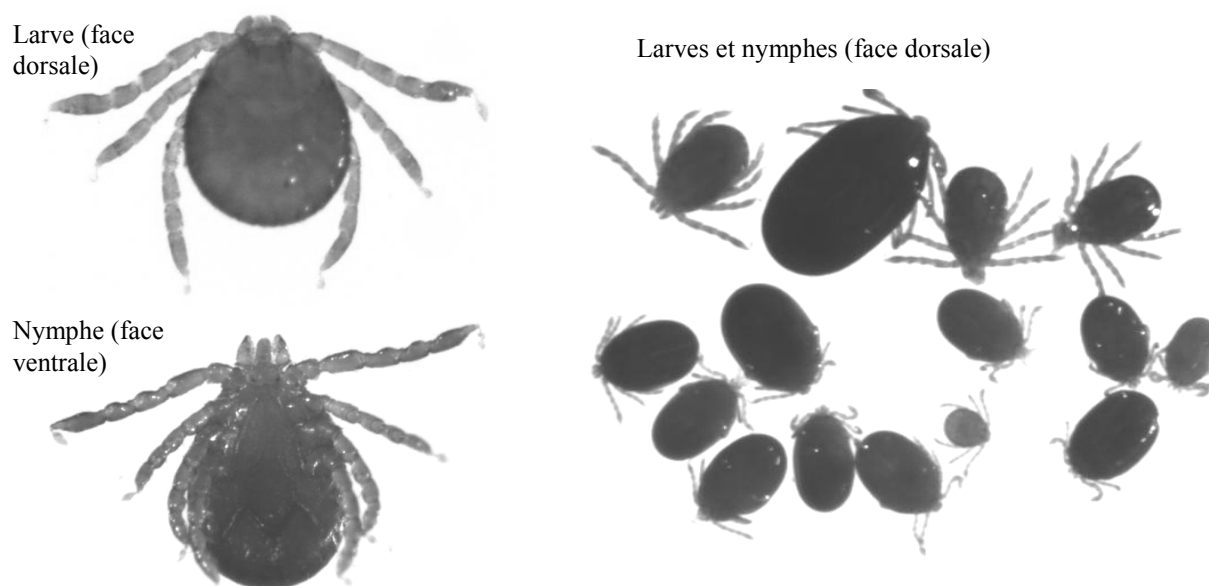
L'extraction d'ARN à partir des **écouvillons cloacaux** a été effectuée pour toutes les pies ayant un titre en séroneutralisation supérieur ou égal à 20 et quatre pies ayant un titre inférieur à 20. Au total, 35 échantillons ont été testés en RT-PCR et Nested-PCR.

Un prélèvement a présenté un **résultat positif en Nested-PCR**. Il s'agit de la pie FA18924, de première ou deuxième année, prélevée sur le site des S<sup>tes</sup> Maries de la Mer le 4 août 2005 et présentant un titre 20 en sérologie (cf. **tableau VI**). Ce résultat est très important car il **révèle l'existence d'une circulation du virus WN en Camargue en 2005**. Il montre en outre que **des individus présentant un titre faible en sérologie peuvent néanmoins participer à la circulation du virus WN**. Cette même pie a ensuite été re-capturée le 11 août mais l'écouvillon cloacal effectué à cette date était négatif.

Seuls les écouvillons buccaux et les plumes prélevés sur cette pie FA18924 les 4 et 11 août ont été traités : ils sont négatifs en RT-PCR et Nested-PCR. Les autres écouvillons buccaux et échantillons de plumes en croissance n'ont pas encore été analysés.

### 3.4.4 Ectoparasites

Une quantité importante d'ectoparasites a été trouvée sur les pies capturées. Sur les 339 fois où nous avons examiné un individu (recaptures incluses), nous avons vu et prélevé au moins une tique à 54 reprises (16%), un pou mallophage à 51 reprises (15%) et un hippoboscidé à 7 reprises (2%). Vingt-six individus (7,7%) étaient porteurs à la fois de tiques et de mallophages. Les tiques sont en très grande majorité des larves et des nymphes du genre *Haemaphysalis*, trouvées parfois en grand nombre sur un même individu (**figure 11**).



**Figure 11** : Larves et nymphes *Haemaphysalis* sp. prélevées sur une même pie (photographies : plateau technique PLATIM, IFR 128, BioSciences Lyon-Gerland).

### 3.4.5 Discussion sur la circulation du virus West Nile en période post-épizootique

Les investigations menées sur les pies bavardes en 2005 montrent que **le virus WN a circulé dans toute la Camargue** (probablement en 2004) puisqu'on retrouve des pies adultes séropositives dans les trois principaux sites d'études (« Tour du Valat », « Scamandre-Aigues-Mortes », « Astouin-S<sup>tes</sup> Maries de la Mer »). Nos résultats ne nous permettent pas de conclure pour ce qui concerne la partie localisée au nord du delta du Rhône (Générac) car seules des pies adultes ont été trouvées séropositives et un seul individu adulte a été capturé sur le site de Générac. Ce biais de sélection est associé au type de piège utilisé sur ce site. En effet, les grandes cages à corvidés attrapent surtout des jeunes alors que les cages avec appelant capturent plus facilement des adultes, ceux-ci étant territoriaux pendant la période de nidification.

L'association entre séropositivité pour le virus WN et la classe d'âge (pies adultes) traduit soit le fait que la probabilité de contact avec le virus augmente avec l'âge (circulation

endémique dans la population), soit le fait que la plupart des pies ont rencontré le virus en 2004 (lors d'une circulation épizootique). Il faudrait poursuivre les investigations sur une période post-épizootique plus longue pour trancher entre ces deux hypothèses.

Le suivi sérologique des pies recapturées ne fait apparaître que des modifications de titre d'un facteur deux. Or, en sérologie, la répétitivité des tests n'étant pas de 100%, on considère que seules les modifications de l'ordre d'un facteur 4 correspondent à un changement réel (Thrusfield 2005). Cette stabilité des titres est elle aussi en faveur d'un **contact ancien** avec le virus. Il est aussi possible que les titres 20 ou 40 observés correspondent à des réactions croisées avec d'autres virus. Le fait que la pie FA16617 présente d'abord un titre de 80 puis un titre 40 laisse toutefois penser que les faibles titres indiquent bien un contact passé avec le virus WN.

La mise en évidence par Nested-PCR d'un fragment de génome viral dans les fientes d'une pie révèle que **le virus WN a probablement circulé à bas bruit en 2005**. L'excrétion virale dans les fientes a été décrite chez des oiseaux infectés expérimentalement (Komar *et al.* 2000) et observée en conditions naturelles aux Etats-Unis (Komar *et al.* 2002). Des investigations complémentaires sont nécessaires pour évaluer si l'excrétion du virus dans les fientes pourrait engendrer une transmission non vectorielle entre les oiseaux de Camargue.

Si le virus a effectivement circulé dans la population de pies en 2005, on peut s'attendre à trouver du génome viral dans les fientes d'individus qui n'ont pas encore synthétisé d'anticorps. L'analyse des écouvillons cloacaux prélevés sur les pies séronégatives nous permettra donc peut-être de mettre en évidence d'autres individus excréteurs du virus.





---

# ***CHAPITRE 4***

---

## ***Discussion générale***



# 1. Discussion sur les oiseaux sauvages de Camargue et le virus West Nile en période épizootique (année 2004) et post-épizootique (année 2005)

L'année 2004 a été marquée par l'émergence du virus WN chez les chevaux de Camargue avec **32 cas cliniques** confirmés, concentrés essentiellement sur la commune des S<sup>tes</sup> Maries de la Mer. Quelques cas ont également été rapportés plus à l'ouest (Aigues-Mortes et Saint Laurent d'Aigouze), au nord (Le Cailar, Beauvoisin, Saint Gilles) et à l'est (Arles).

La circulation du virus WN à proximité des S<sup>tes</sup> Maries de la Mer a d'abord été détectée grâce à la séroconversion, entre le 4 juin et le 20 juillet, de l'une douze **poules sentinelles** placées sur cette commune (*figure 12*). Puis, six autres poules de ce groupe ont présenté une séroconversion entre le 10 août et le 9 septembre. Les deux premiers cas cliniques équin ont été détectés pendant cet intervalle de temps (27 août). Le dernier cas confirmé a été rapporté le 14 octobre mais l'**isolement du virus WN à partir d'une Pie bavarde** prélevée sur la commune des S<sup>tes</sup> Maries de la Mer le 21 octobre montre que celui-ci était toujours en circulation.

Sur le site de la Tour du Valat, la présence du virus WN a été mise en évidence par la séroconversion d'un canard sentinelle entre le 21 septembre et le 8 octobre (*figure 12*). L'**isolement du virus a été effectué à partir d'un Moineau domestique** prélevé sur ce même site le 18 octobre mais aucun des chevaux présents à cet endroit n'ont présenté de signes cliniques. Une pie et un moineau positifs en sérologie ont de plus été observés sur ce site le 2 septembre et le 12 octobre respectivement.

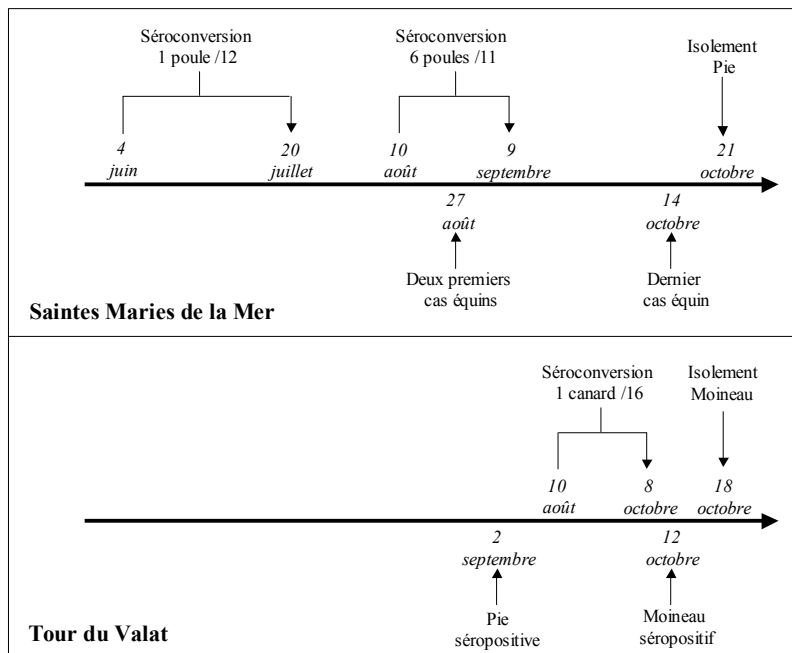


Figure 12 : Chronologie des événements relatifs aux sites des S<sup>tes</sup> Maries de la Mer et de la Tour du Valat pendant l'année 2004.

Les investigations sérologiques effectuées sur les oiseaux sauvages de Camargue au cours de l'année 2004 ont permis de mettre en évidence la présence d'anticorps spécifiques du virus WN dans les trois catégories d'oiseaux étudiées : migrateurs en provenance d'Afrique potentiellement introducteurs, oiseaux nicheurs coloniaux potentiellement amplificateurs, et espèces sédentaires potentiellement amplificatrices et disséminatrices du virus. Toutefois, alors qu'il s'agit d'une année épizootique, **la prévalence observée tous sites confondus est relativement faible** chez les espèces testées (environ 3% chez les migrateurs, 0,5% chez les moineaux domestiques et friquets, 1% chez les poussins de hérons garde-bœufs) sauf pour les pies bavardes (12,5%). La prévalence globale estimée en tenant compte de l'ensemble des sites de capture est en fait **biaisée par une forte hétérogénéité spatiale**. En effet, les cas cliniques équins se sont pour la plupart déclarés sur la commune des S<sup>tes</sup> Maries de la Mer. Sur ce site, nous n'avons prélevé que quatre pies bavardes, dont deux positives en sérologie et une positive en sérologie et virologie (cf. **article 4**). Aucune autre espèce n'ayant été prélevée à proximité des S<sup>tes</sup> Maries de la Mer en 2004, il n'est pas possible de savoir si ces résultats indiquent l'existence, au sein du foyer épizootique, d'un fort niveau de contact entre le virus WN et l'avifaune en général, ou s'ils traduisent le fait que les pies bavardes sont particulièrement exposées au virus. La deuxième hypothèse est toutefois probable car la prévalence sérologique estimée chez cette espèce en 2004 sur le site de la Tour du Valat est assez élevée, avec 1 individu positif sur 23 ; de plus, en 2000, 4 pies sur 18 s'étaient avérées positives en sérologie lors des investigations menées par l'ONCFS (Hars *et al.* 2004). Les captures de moineaux domestiques et friquets ont été réalisées uniquement sur deux sites : le domaine de la Tour du Valat et ses environs, et le Marais du Vigueirat, situé de l'autre côté du Grand Rhône. Ce second site étant éloigné du foyer d'émergence, il est possible que le virus WN ne soit pas arrivé jusque là. Sur le site de la Tour du Valat, l'enquête sérologique indique la présence d'un Moineau domestique positif en sérologie sur 60 testés. Ce résultat n'est pas statistiquement différent de celui observé pour les pies bavardes.

**L'isolement du virus WN** à partir du cerveau d'une Pie bavarde et d'un Moineau domestique conforte l'hypothèse selon laquelle ces deux espèces sont probablement impliquées dans l'amplification du virus à proximité des écuries. Bien qu'aucun examen anatomopathologique n'ait été effectué, cet isolement soulève la question d'un possible effet pathogène du virus WN chez les oiseaux sauvages de Camargue.

En 2005, aucun cas clinique n'a été rapporté, et aucune séroconversion détectée parmi les oiseaux sentinelles captifs testés dans le cadre du programme national de surveillance de l'infection de l'avifaune par le virus WN (Hars *et al.* 2005b). Toutefois, la détection d'un fragment de génome viral par Nested-PCR dans les fientes d'une Pie bavarde, capturée sur le 4 août 2005 à proximité des S<sup>tes</sup> Maries de la Mer, indique que le virus WN a probablement **circulé au sein de l'avifaune de Camargue en 2005**.

## 2. Discussion sur les méthodes utilisées

Les investigations épidémiologiques sur les maladies de la faune sauvage sont toujours confrontées à deux difficultés majeures : (1) décrire, qualitativement et quantitativement, la population d'étude ; (2) détecter, dans cette population, les animaux porteurs de l'agent pathogène étudié grâce à des méthodes de laboratoire adaptées.

### 2.1 Méthodes d'études des oiseaux sauvages

#### 2.1.1 Description de la population

Une connaissance générale de la **diversité spécifique** et de l'**abondance** des oiseaux de Camargue est indispensable pour pouvoir identifier les espèces impliquées dans la circulation du virus WN. En effet, les espèces migratrices sont des candidates potentielles à l'introduction du virus ; les espèces nicheuses peuvent être responsables de son amplification printanière et estivale ; les espèces sédentaires ou hivernantes sont de possibles réservoirs pendant l'hiver, quand l'activité des moustiques vecteurs s'arrête.

A l'échelle de la Camargue, la population d'oiseaux ne peut pas être décrite précisément et nécessite l'utilisation d'estimations. En tant que carrefour pour la zone paléarctique, la Camargue accueille un nombre d'oiseaux très important en terme d'espèces et d'individus. De plus, les effectifs sont en constante variation en raison des flux migratoires et des déplacements locaux. La population des différentes espèces présentes peut être **estimée** en ayant recours à différentes méthodes d'observation ou de capture, marquage et recapture (cf. **annexe 1**). Les sources de biais sont multiples et l'extrapolation des données d'un site à un autre est souvent difficile (Wobeser 1994, Sutherland 1996, Bibby *et al.* 2000, Yoccoz *et al.* 2001). Les estimations obtenues à l'échelle de la Camargue présentent donc une large marge d'erreur par rapport à la réalité, mais elles permettent néanmoins de dégager des tendances. Ce sont ces tendances que nous avons tenté de faire ressortir en proposant des **indices d'abondance et de diversité**.

A une échelle locale, nous avons eu recours à des **comptages** (méthode des itinéraires échantillons) pour décrire l'avifaune environnante des écuries ayant eu des chevaux infectés par le virus WN. Cette approche présente l'avantage de décrire directement la population d'étude. Toutefois, elle présente certains biais. En effet, la durée des comptages étant limitée, des espèces discrètes, ou très mobiles mais habituellement présentes sur le site, peuvent passer inaperçues. Inversement, certains individus peuvent être comptés deux fois s'ils se déplacent rapidement.

## 2.1.2 Analyse des mouvements migratoires

La connaissance des **sites dans lesquels séjournent les oiseaux migrants** aide à identifier les agents infectieux susceptibles d'être transportés par ces oiseaux et introduits en Camargue. Il existe de nombreuses méthodes d'étude des déplacements des oiseaux migrants, chacune avec des avantages et des inconvénients selon les questions posées (Gauthier-Clerc & Le Maho 2001, Marchant 2002).

Les données de **reprises de bagues** permettent par exemple de montrer en quels lieux certains oiseaux bagués en Camargue sont retrouvés. Néanmoins, ces données sont biaisées car la pression d'observation est variable sur le plan spatial et temporel (Wernham & Siriwardena 2002). Ainsi, la probabilité pour qu'un oiseau mort bagué soit signalé dépend de différents facteurs tels que la densité de population humaine et le degré de connaissance de cette population sur les oiseaux, l'abondance des animaux charognards et la taille de l'oiseau. De même, la probabilité de recapture ou de ré-observation par des ornithologues n'est pas homogène dans l'espace et dans la saison.

La **télémetrie satellitaire** permet de suivre le trajet d'un même individu. Cette méthode étant très coûteuse, très peu d'oiseaux sont en général marqués, et ce petit nombre peut ne pas être représentatif de la population (Marchant 2002). Dans notre étude, par exemple, les quatre hérons pourprés équipés ont pris une même voie de migration orientée sud sud-ouest alors que les reprises de bagues indiquent l'existence d'une seconde voie passant par l'Italie (Voisin 1996). En outre, cette technique est limitée, à l'heure actuelle, aux oiseaux de grand gabarit en raison de la taille et du poids des balises (18 grammes au minimum). Pour les balises de petite taille, la batterie se décharge rapidement et le pouvoir de transmission est moins important, donc la précision de localisation des oiseaux est moins bonne. Or, même avec des balises de 30 grammes, la précision des localisations est souvent de mauvaise qualité (cf. *chapitre 2*).

## 2.2 Méthodes de laboratoire

### 2.2.1 Choix des techniques sérologiques

Pour évaluer la séroprévalence de l'avifaune sauvage vis-à-vis du virus WN, il faut disposer d'un **test capable de reconnaître des anticorps spécifiques du virus quelle que soit l'espèce d'oiseau considérée**. Or, la plupart des tests sérologiques commercialisés sont mis au point et validés pour seulement une ou quelques espèces, et la transposition à une autre espèce, même phylogénétiquement proche, peut poser des problèmes d'interprétation (Wobeser 1994, Gardner *et al.* 1996). Il est donc nécessaire d'avoir recours à des techniques qui permettent de s'affranchir des problèmes de reconnaissance spécifique. Nous avons expérimenté plusieurs de ces techniques pour pouvoir tester les sérums prélevés sur les

oiseaux sauvages de Camargue en 2004. La principale limite associée à ces étapes de mise au point a été la nécessité de disposer d'une grande quantité de **sérums témoins positifs**.

Le système immunitaire des oiseaux est moins bien connu que celui des mammifères et a surtout été étudié chez les Galliformes et les Anseriformes domestiques (Roitt *et al.* 1997, Wakelin & Apanius 1997). Ces recherches ont montré que le nombre de gènes d'immunoglobulines est limité chez les oiseaux. Il peut donc être envisagé d'utiliser des anticorps capables de reconnaître de façon croisée les immunoglobulines de différentes espèces (Chiles & Reisen 1998, Martinez *et al.* 2003). Pour le virus WN, une technique **ELISA indirect** utilisant un conjugué commercialisé anti-oiseaux s'est avérée efficace pour analyser les sérums de plusieurs espèces sauvages d'Amérique du Nord (Ebel *et al.* 2002, Gancz *et al.* 2005). Malheureusement, sur les 27 espèces de Camargue que nous avons testées, seules 6 ont été reconnues par ce conjugué anti-oiseaux (cf. **chapitre 3**). Nous avons donc cherché d'autres méthodes applicables pour ces espèces.

L'utilisation de protéines A ou G (Nielsen *et al.* 2005) ou d'anticorps monoclonaux (Blitvich *et al.* 2003a, Blitvich *et al.* 2003b) permet en théorie de tester tous les sérums, quelle que soit l'espèce dont ils sont issus. Suite à l'émergence du virus WN aux Etats-Unis, les recherches sur cette maladie se sont accélérées et différents **anticorps monoclonaux** ont été sélectionnés et mis sur le marché. Une technique ELISA par compétition est actuellement utilisée par différents laboratoires pour estimer la séroprévalence du virus WN dans l'avifaune sauvage (Jozan *et al.* 2003, Farfan-Ale *et al.* 2004, Ringia *et al.* 2004, Komar *et al.* 2005b, Lefrancois *et al.* 2005). Cette méthode présente néanmoins l'inconvénient de nécessiter une grande quantité de sérum et nous l'avons trouvée délicate à mettre au point (cf. **chapitre 3**).

Nous avons donc eu recours à la **séroneutralisation**, qui n'est possible que dans les laboratoires disposant d'installations sécurisées de niveau trois, avec une technique en plaque 96 puits (microneutralisation). Même si la plupart des études ont toujours recours à la technique de référence en plaque 12 puits (Savage *et al.* 1999, Komar *et al.* 2001, Ludwig *et al.* 2002, Nasci *et al.* 2002, Buckley *et al.* 2003, Komar *et al.* 2003b, Godsey *et al.* 2005, Gibbs *et al.* 2006), cette méthode de microneutralisation est de plus en plus employée car elle permet de tester un grand nombre d'échantillons à la fois et requiert seulement une faible quantité de sérum (Malkinson *et al.* 2002, Banet-Noach *et al.* 2004, Stout *et al.* 2005).

Des techniques anciennes, comme l'inhibition de l'hémagglutination classiquement utilisée autrefois (Nir *et al.* 1969, Kolman *et al.* 1976, Gordeeva 1982, Juricova *et al.* 1989), sont encore utilisées dans certains pays (Juricova *et al.* 1998, Jamgaonkar *et al.* 2003, Samoiloova *et al.* 2003). Elles sont performantes mais ne sont plus guère employées car elles nécessitent la manipulation de composés volatiles pouvant entraîner des contaminations de laboratoire par formation d'aérosols (Zeller, communication personnelle).



## 2.2.2 Qualité des tests sérologiques

La validation des épreuves sérologiques pour le diagnostic des maladies infectieuses nécessite en théorie toute une série de procédures (Jacobson 1998). Suite à la procédure expérimentale dont nous avons parlé précédemment, il faut normalement évaluer, pour chacune des techniques, la **spécificité** (aptitude à fournir une réponse négative chez un animal indemne = vrais négatifs) et la **sensibilité** (aptitude à fournir une réponse positive chez un animal infecté = vrais positifs). Ces valeurs sont déterminées en utilisant des sérums dont le statut positif ou négatif est connu grâce à une technique servant de référence.

Lors des investigations sur la faune sauvage, les valeurs de la spécificité et la sensibilité des tests utilisés sont rarement connues. Quand on s'intéresse à une maladie rare dans la population étudiée, il est pourtant important de s'assurer de la bonne **spécificité** du test. En effet, si la **prévalence dans la population est faible**, un oiseau qui présente un test positif a une faible probabilité de posséder effectivement des anticorps spécifiques de la maladie. En épidémiologie, on dit dans ce cas que la valeur prédictive d'un test positif est faible ou, ce qui est équivalent, que le risque de faux positifs est élevé (Thrusfield 2005). Au cours de nos investigations sérologiques sur les moineaux, nous avons observé un seul oiseau positif sur 196 individus en bonne santé testés avec la technique ELISA indirect. On pourrait donc penser que ce résultat correspond à un faux positif. Toutefois, nous avons également observé un résultat positif en ELISA indirect sur un moineau moribond, et le virus WN a pu être isolé à partir d'une biopsie de cerveau prélevée sur ce moineau. Cet isolement confirme la présence du virus WN dans la population de moineaux et indique que la sérologie positive, observée par sondage chez les moineaux en bonne santé, est très probablement spécifique de ce virus. De plus, la positivité en ELISA indirect des échantillons a été confirmée par la technique de séroneutralisation qui est reconnue très spécifique.

Le risque d'avoir des échantillons faussement positifs peut être limité en confirmant les résultats avec une méthode plus spécifique, comme nous venons de le voir, mais aussi en élevant la valeur du seuil de positivité. C'est pourquoi, d'une part, les échantillons positifs en ELISA indirect étaient ensuite **confirmés en séroneutralisation** et, d'autre part, le **seuil de positivité** en séroneutralisation a été placé au titre 80. Ce titre élevé est particulièrement justifié pour les oiseaux migrateurs en provenance d'Afrique. En effet, ces oiseaux ont pu être en contact avec d'autres virus de la famille des Flaviviridae avec lesquels des réactions croisées pourraient être observées en sérologie, comme par exemple le virus Usutu (Mackenzie *et al.* 2002, Hubalek 2004). Ce seuil élevé peut paraître moins adapté pour les espèces résidentes puisque, dans l'état actuel des connaissances, il n'existe pas d'autre flavivirus en circulation en Camargue. Il est donc préférable, dans un contexte local, de considérer la **distribution des titres observés**, comme nous l'avons fait pour les pies prélevées en 2005.

Enfin, quand la prévalence est faible, il est important de travailler sur des **espèces particulièrement exposées** pour diminuer le risque de faux positifs. C'est pour cette raison que nous nous sommes particulièrement intéressés à la Pie bavarde en 2005. En effet, c'est chez cette espèce que les plus fortes sérologies ont été observées dans notre étude en 2004 et lors des précédentes investigations en 2000 (Hars *et al.* 2004).

### 2.2.3 Cinétique des anticorps

Une réaction positive à un test sérologique signifie que les animaux ont probablement été en contact avec l'agent pathogène recherché et ont produit des anticorps contre cet agent à un titre mesurable à la date du prélèvement. La séroprévalence observée dans la population dépend donc de la fréquence d'infection mais aussi de la **vitesse de disparition des anticorps**. En l'absence d'autre stimulation, le niveau d'anticorps décline au cours du temps, à une vitesse qui peut être évaluée par une mesure de demi-vie. Cette vitesse est variable selon les anticorps et est rarement estimée. Pour le virus WN, les quelques études menées à ce sujet ont montré que les anticorps persistaient pendant au moins un an et demi chez les espèces étudiées : la Tourterelle maillée *Streptopelia senegalensis* et le Pigeon biset *Columba livia* (McIntosh *et al.* 1969, Gibbs *et al.* 2005).

Les études effectuées sur d'autres arbovirus, proches du virus WN, indiquent également une persistance des anticorps sur le long terme. Toutefois, les résultats apparaissent variables en fonction des espèces d'oiseaux et en fonction du test sérologique utilisé. Ainsi, pour le virus de l'Encéphalite de Saint Louis (SLE, famille des Flaviviridae), il a été montré, chez le Roselin familier *Carpodacus mexicanus*, que les anticorps neutralisants diminuent rapidement alors que les anticorps inhibiteurs de l'hémagglutination sont toujours détectables après un an (Reisen *et al.* 2001). En revanche, une étude chez le Moineau domestique a montré que des anticorps neutralisants et inhibiteurs de l'hémagglutination sont toujours détectables au titre 20 deux ans après inoculation du virus (McLean *et al.* 1983). Par ailleurs, pour le virus de l'Encéphalite Equine de l'Est (EEE, famille des Togaviridae), la présence d'anticorps neutralisants a été observée pendant plus de trois ans chez certains Passériformes alors que, pour d'autres, les titres en anticorps devenaient rapidement indétectables (Main *et al.* 1988).

Ces quelques études soulignent la nécessité d'interpréter avec prudence les résultats des investigations sérologiques effectuées sur des oiseaux sauvages adultes dont l'histoire de vie est totalement inconnue.

## 2.2.4 Les techniques directes

Les techniques directes mettent en évidence le virus (**isolement**) ou des fragments de génome viral (**RT-PCR** et **Nested-PCR**) et permettent donc d'éviter les problèmes d'interprétation rencontrés en sérologie : un résultat positif indique que le virus était présent dans l'échantillon au moment où celui-ci a été prélevé. De plus, si un fragment suffisamment grand du génome viral peut être amplifié, une **description précise de la souche virale** en circulation est possible par analyse phylogénétique (cf. *article 4*).

Dans le contexte européen de circulation du virus WN, ces techniques sont toutefois moins fréquemment utilisées sur les oiseaux sauvages que la sérologie. La raison principale est la **faible probabilité d'obtenir un résultat positif** car le virus est peu prévalent. A titre d'exemple, lors d'une étude réalisée dans les années soixante-dix en Israël, il n'a été possible d'isoler le virus WN qu'à partir du sang de trois oiseaux sur 7352 individus testés (Nir *et al.* 1972) alors que la circulation du virus dans la région était connue (Nir *et al.* 1969). De plus, ces techniques sont plus **onéreuses** et **contraignantes** que les techniques sérologiques. Le virus WN est fragile et les prélèvements doivent être acheminés au laboratoire et stockés à une température de -80 °C pour optimiser les chances d'isolement.

Pour les techniques de biologie moléculaire, le choix des primers utilisés est crucial puisqu'il détermine la sensibilité et la spécificité du test. Dans le cadre de notre étude, la technique de Nested-PCR est extrêmement **sensible** puisqu'elle permet de détecter une unique particule virale présente dans l'échantillon. L'inconvénient est que les contaminations sont fréquentes et qu'il existe un **risque élevé d'obtenir des faux positifs**. De plus, les primers que nous avons utilisés ne sont capables d'amplifier que les virus WN appartenant à la lignée 1. Un virus WN de lignée 2 ayant été récemment isolé en Europe (Bakonyi *et al.* 2006), l'utilisation de primers moins spécifiques pour tester les oiseaux de Camargue serait pertinente.

D'une façon générale, les techniques sérologiques et les techniques directes s'avèrent complémentaires : la sérologie permet de détecter la présence du virus dans une population à faible prévalence ; les techniques directes sont moins souvent positives mais sont plus riches d'informations puisqu'elles permettent de caractériser le virus en circulation. Elles sont surtout pertinentes pour des populations chez lesquelles la prévalence est élevée. La forte séroprévalence et la mise en évidence du génome viral chez la **Pie bavarde** à deux reprises (en 2004 sur cerveau et en 2005 sur fientes) suggèrent que cette espèce est une bonne candidate pour rechercher le virus WN par technique directe (cf. *chapitre 3*).

### 3. Synthèse des connaissances sur les oiseaux sauvages de Camargue et le virus West Nile

#### 3.1 Rôle dans l'introduction

L'isolement de souches du virus WN proches phylogénétiquement dans des localisations géographiques très éloignées montre qu'il existe une circulation de ce virus entre continents (Berezin 1971, Charrel *et al.* 2003). La principale hypothèse avancée pour expliquer ces flux de virus est un transport par les oiseaux sauvages au cours de leurs déplacements migratoires (Berezin 1971, Hannoun *et al.* 1972, Hubalek & Halouzka 1999, Zeller & Murgue 2001, Rappole & Hubalek 2003). **Trois scénarios** d'introduction du virus en Camargue ont été discutés dans l'**article 3** : (1) par le biais d'oiseaux virémiques récemment infectés ; (2) par le biais d'oiseaux infectés de façon chronique ; (3) par le biais d'ectoparasites infectés transportés par des oiseaux. L'introduction pourrait avoir lieu au printemps, à l'arrivée des oiseaux ayant hiverné en Afrique, ou à l'automne, lors du passage des oiseaux ayant estivé en Europe de l'Est.

Plusieurs arguments sont en faveur d'une introduction à partir de l'**Afrique** : (1) les souches isolées en Afrique s'avèrent proches de celles qui circulent dans le bassin méditerranéen (Murgue *et al.* 2001a) (cf. **article 4**) ; (2) le virus WN est considéré endémique sur la quasi-totalité du continent africain (Murgue *et al.* 2002) ; (3) les oiseaux qui arrivent en Camargue ont subi un stress physiologique (traversée successive du Sahara puis la Mer Méditerranée) susceptible de favoriser une réactivation virale.

Le virus WN est également endémique dans certaines régions d'**Europe de l'Est** (Hubalek *et al.* 2000, Campbell *et al.* 2001, Bakonyi *et al.* 2006). Il pourrait donc être introduit en Camargue par des oiseaux migrateurs provenant de cette région. L'introduction pourrait être favorisée par l'arrivée massive de juvéniles qui, étant des hôtes naïfs vis-à-vis du virus, pourraient être particulièrement impliqués dans le portage de celui-ci (Savage *et al.* 1999). Ainsi, en Israël, de jeunes cigognes probablement nées en Europe centrale ont été trouvées malades et infectées par le virus WN en pleine période migratoire (Malkinson *et al.* 2001, Malkinson *et al.* 2002).

Une liste d'oiseaux candidats à l'introduction du virus WN en Camargue, à partir d'Afrique et d'Europe de l'Est, a été proposée dans l'**article 2**. Cette liste, qui regroupe 122 espèces, est très large car elle s'appuie sur des critères peu discriminants : le type d'habitat (zone humide), le statut migrateur, la zone de provenance et la période de présence en Camargue. Certains critères complémentaires pourraient permettre d'affiner cette liste.

Les recherches effectuées récemment sur les vecteurs du virus WN en Camargue ont en effet permis de préciser la dynamique saisonnière et journalière des deux espèces de moustiques ornithophiles les plus abondantes en Camargue : *Cx. pipiens* et *Cx. modestus* (Balenghien 2006, Balenghien *et al.* 2006). Ces deux espèces sont compétentes pour la transmission du virus WN en conditions expérimentales, mais le taux de transmission est nettement meilleur pour *Cx. modestus* que pour *Cx. pipiens* (Balenghien 2006). Les moustiques *Cx. modestus* étant abondants et réputés peu dispersifs, les espèces d'oiseaux qui fréquentent les **roselières** et les **ripisylves** (gîtes de repos des femelles *Cx. modestus*) sont probablement très exposées aux piqûres de ce moustique. Les migrateurs africains qui fréquentent ces milieux et arrivent en Camargue à la période où *Cx. modestus* est abondant sont donc de bons candidats à l'introduction du virus (cf. **article 3**).

Par ailleurs, les oiseaux ayant une **vitesse de migration rapide** ont une probabilité plus grande que les autres oiseaux d'être encore virémiques lorsqu'ils arrivent en Camargue, s'ils ont été infectés peu avant leur départ. La vitesse de migration dépend de la vitesse de vol, mais surtout du nombre et de la durée des arrêts effectués au cours du trajet migratoire (Alerstam 2003). Les espèces qui effectuent leur migration depuis l'Afrique sub-Saharienne sans escale arrivent donc plus rapidement sur le continent européen que celles qui s'arrêtent en route pour se reposer et s'alimenter. Des espèces très proches phylogénétiquement, telles que la Rousserole effarvate *Acrocephalus scirpaceus* et le Phragmite des joncs *Acrocephalus schoenobaenus*, qui fréquentent tous deux les roselières, peuvent présenter des comportements migratoires totalement distincts. Ainsi, des études réalisées pendant la migration d'automne ont montré que la Rousserole effarvate effectue sa migration par étapes successives, alors que le Phragmite des joncs vole pendant plus de trois jours et trois nuits sans aucun arrêt (Alerstam 1990, Schaub & Jenni 2001). Si la stratégie migratoire est la même pendant la migration de printemps, pour une exposition similaire au virus WN en Afrique, le Phragmite des joncs aurait donc une probabilité plus grande que la Rousserole effarvate d'introduire le virus WN en Europe.

La **durée des escales** effectuées pendant la migration est également un facteur important puisqu'elle conditionne la probabilité pour que les pathogènes portés par un oiseau migrateur soient transmis à la population locale d'oiseaux. Ainsi, un oiseau virémique pour le virus WN n'est susceptible d'introduire ce virus en Camargue que s'il reste sur place suffisamment longtemps pour contaminer des moustiques compétents tels que *Cx. modestus*. Cette durée peut être évaluée si les oiseaux sont suivis individuellement, par exemple par télémétrie (Howey 1992) ou par capture, marquage et recapture (Schaub & Jenni 2001).

Les oiseaux particulièrement **exposés aux piqûres de tiques** dans les zones d'endémie du virus WN pourraient aussi constituer de bons introducteurs. Les oiseaux les plus parasités sont en général ceux qui fouissent le sol pour rechercher leur nourriture, en particulier ceux de la famille des Turdidés (Ernek *et al.* 1972, Kaiser & Hoogstraal 1974, Comstedt *et al.* 2006).

Par ailleurs, comme nous l'avons mentionné dans l'**article 1**, la mondialisation des échanges (mobilité des hommes, transport d'animaux domestiques ou sauvages, commerce de marchandises) peut également conduire à une introduction d'agents pathogènes (Morse 1995, Anonyme 2004, McMichael 2004, Karesh *et al.* 2005). La Camargue se trouve à proximité de deux aéroports (Montpellier et Marseille) et du port de Fos. Une importation de moustiques ou d'oiseaux infectés pourrait donc se produire par l'intermédiaire de navires ou d'avions en provenance de zones où le virus WN est en circulation.

## **3.2 Rôle dans l'amplification**

Si elle se produit seule, l'introduction du virus WN est insuffisante pour entraîner la mise en place d'une circulation locale en Camargue. Pour qu'un cycle local s'installe, cette première phase d'invasion doit être suivie d'une phase d'amplification, c'est-à-dire d'une augmentation globale du niveau de circulation virale (augmentation du nombre de vecteurs et d'hôtes infectés).

L'amplification ne peut se produire que si un certain nombre de conditions relatives aux hôtes, aux vecteurs et à l'environnement sont rassemblées (cf. **chapitre 1**). Un oiseau amplificateur doit à la fois (McLean 1991, Scott & Edman 1991, Rodhain 1998) :

- Etre **abondant**,
- Etre **accessible** aux vecteurs dans le temps (saisonnalité et nyctémère) et dans l'espace (partage des mêmes micro-habitats),
- Etre **attractif et tolérant** pour les vecteurs (préférence trophique du vecteur, absence de comportement de défense : animaux endormis, malades, jeunes...),
- Répondre à l'infection avec une **virémie** d'amplitude et de durée suffisante pour infecter une grande quantité de nouveaux vecteurs,
- Avoir une **faible probabilité de mortalité** associée à l'infection,
- Présenter une dynamique de population telle que des **individus sensibles** (naïfs sur le plan immunologique) entrent régulièrement dans la population.

Pour la Camargue, l'**article 2** propose une liste d'espèces potentiellement impliquées dans l'amplification du virus WN. Cette liste est peu discriminante puisqu'elle repose uniquement sur la période de présence des espèces en Camargue, le type d'habitat qu'elles occupent et leur abondance. Nous souhaitons en effet établir à ce stade une liste exhaustive permettant d'une part, d'aider à sélectionner des espèces pertinentes à étudier sur le terrain et, d'autre part, de servir de référence au fur et à mesure de l'avancement des investigations. En effet, le choix des espèces étudiées sur le terrain est souvent biaisé en faveur d'espèces faciles à capturer, à manipuler et à prélever. Il est donc important de pouvoir s'assurer *a posteriori* que des espèces potentiellement impliquées dans le cycle de transmission n'ont pas été négligées.

Les études épidémiologiques menées en 2004 ont montré que le virus WN circulait chez le **Moineau domestique**, une espèce abondante en Camargue (Blondel & Isenmann 1981). D'après les infections expérimentales effectuées avec la souche kenyane KN-3829, qui appartient au même cluster que la souche isolée en Camargue en 2004 (cf. **article 4**), le Moineau domestique répond à l'infection avec une virémie d'amplitude et de durée suffisante pour infecter une grande quantité de nouveaux vecteurs (Langevin *et al.* 2005). Ces résultats sont concordants avec ceux décrits par Work *et al.* (1955) avec la souche égyptienne Ar-248. Toutefois, avant de conclure que le Moineau domestique est un hôte amplificateur important pour le virus WN en Camargue, il reste à démontrer que cette espèce est fortement piquée par les moustiques vecteurs et qu'elle est peu sensible à l'infection.

De même, les études effectuées sur la **Pie bavarde** en 2004-2005, mais également en 2000 (Hars *et al.* 2004), montrent que les oiseaux de cette espèce développent fréquemment des anticorps vis-à-vis du virus WN. Or, les pies bavardes sont fréquentes dans les différents habitats de Camargue (Blondel & Isenmann 1981, Bardot 2001). De plus, elles possèdent probablement une forte compétence d'hôte car elles appartiennent à la famille des Corvidés, suspectée d'être particulièrement impliquée dans la transmission du virus WN (Work *et al.* 1955, Komar *et al.* 2003a, Reisen *et al.* 2006a). L'infection expérimentale avec la souche NY99 d'une espèce proche, la Pie à bec noir d'Amérique *Pica hudsonia*, a d'ailleurs montré que la virémie développée pouvait atteindre de fortes valeurs peu après inoculation du virus (Komar *et al.* 2003a). Pour évaluer leur rôle dans l'amplification du virus WN en Camargue, il est maintenant nécessaire, comme pour le Moineau domestique, d'étudier quelle proportion de moustiques vecteurs effectuent leur repas sanguin sur les pies bavardes. En outre, la transmission non vectorielle du virus est hautement probable chez cette espèce puisqu'elle présente fréquemment un comportement charognard, même si son alimentation est essentiellement constituée d'invertébrés (Bigot 1966). Une transmission d'individu à individu, à partir de fèces infectées, doit également être étudiée, en particulier pendant les périodes où les pies se regroupent pour dormir en dortoir (Bardot 2001).

Les colonies, qui concentrent en un même lieu de nombreux poussins et adultes nicheurs, apparaissent idéales pour l'entretien d'un cycle d'amplification virale (Berezin 1971, Marra *et al.* 2004). De plus, des études réalisées dans les années soixante ont montré que le moustique *Cx. modestus* est abondant dans les colonies d'aigrettes (Mouchet *et al.* 1970). Nos investigations sur les poussins de Héron garde-bœufs ne semblent toutefois pas en faveur d'un rôle majeur de ces oiseaux dans l'amplification du virus WN en Camargue.

Pour résumer, il est difficile d'identifier les principales espèces amplificatrices du virus WN en Camargue du fait de la diversité de l'avifaune. Les investigations sérologiques et virologiques menées sur quelques espèces permettent de montrer que celles-ci sont en contact avec le virus et jouent potentiellement un rôle d'amplification. Des investigations complémentaires sont nécessaires pour identifier les espèces qui sont les plus fréquemment

piquées par les moustiques vecteurs, grâce à une **analyse des repas de sang des moustiques**. Il est en effet possible, à partir du sang contenu dans l'estomac des moustiques, d'identifier les espèces qui leur ont servi d'hôte en amplifiant des fragments de génome caractéristiques des différentes espèces de vertébrés (cytochrome b ou ADN mitochondrial) (Apperson *et al.* 2002, Hassan *et al.* 2003, Apperson *et al.* 2004, Kilpatrick *et al.* 2006a, Kilpatrick *et al.* 2006b, Molaei *et al.* 2006). Pour être valide, cette méthode doit s'appuyer sur des échantillons de moustiques représentatifs, c'est-à-dire de grande taille et non biaisés par la technique ou le site de piégeage (Eldridge 2000). Aux Etats-Unis, cette approche a permis de montrer que le Merle américain *Turdus migratorius* est probablement l'un des principaux amplificateurs du virus WN dans certaines régions (Kilpatrick *et al.* 2006a, Kilpatrick *et al.* 2006b, Molaei *et al.* 2006).

### 3.3 Rôle dans l'émergence

Le terme d'émergence est utilisé ici pour désigner la phase de transmission du virus qui aboutit à l'apparition de **cas cliniques** chez les hôtes sensibles. L'apparition de symptômes chez l'Homme ou le Cheval permet en effet de révéler la circulation du virus qui, jusque là, restait silencieuse. Cette phase débute par l'apparition de cas sporadiques dont la détection repose sur les autorités médicales ou vétérinaires.

La transmission du virus WN au Cheval ou à l'Homme nécessite la présence de **vecteurs capables de transmettre le virus des oiseaux amplificateurs aux mammifères**. En Camargue, les espèces de moustiques capables de piquer à la fois les oiseaux, les chevaux et les hommes ont récemment été décrites (Balenghien *et al.* 2006). Parmi ces espèces, seules deux semblent pouvoir assurer la transmission du virus : *Cx. modestus* et *Cx. pipiens* (Balenghien 2006). Ces deux espèces étant considérées comme peu dispersives, les oiseaux à l'origine de la contamination des vecteurs se trouvent probablement à proximité du lieu où les chevaux cliniquement atteints sont présents. On peut donc suspecter les **oiseaux présents aux environs des écuries durant la nuit** d'être impliqués dans la transmission du virus WN aux vecteurs (cf. *chapitre 2* et *article 4*). Les espèces qui nichent fréquemment dans les bâtiments, comme le Moineau domestique, devraient en particulier faire l'objet d'investigations complémentaires car les poussins sont suspectés de pouvoir maintenir un fort niveau de virémie (Savage *et al.* 1999).

L'émergence du virus WN chez les hôtes sensibles se produit généralement en **fin d'été** (Mouchet *et al.* 1970, Hubalek & Halouzka 1999, Murgue *et al.* 2001b, Murgue *et al.* 2002, Zeller *et al.* 2004). Cette même chronologie est d'ailleurs observée pour les virus responsables d'encéphalites équine sur le continent américain (Edman & Taylor 1968, Scott & Edman 1991, Crans *et al.* 1994). Il existe donc, à cette période de l'année, un environnement propice à la transmission de ces arbovirus aux hôtes sensibles. En Camargue, la **densité de**



**moustiques vecteurs** est maximale en fin d'été (Mouchet *et al.* 1970, Balenghien *et al.* 2006), ce qui pourrait expliquer que l'on assiste à une recrudescence du nombre de piqûres sur les mammifères à cette période. Une augmentation du comportement de défense des oiseaux, en présence d'une forte densité de vecteurs, pourrait par exemple conduire les moustiques à se nourrir sur des hôtes moins vigilants (Nelson *et al.* 1976, Scott & Edman 1991). Il est aussi possible qu'un changement de préférence trophique des oiseaux vers les mammifères se produise, augmentant la probabilité pour qu'un moustique contaminé par un oiseau se nourrisse ensuite sur un mammifère (Edman & Taylor 1968). Enfin, une modification des espèces et des effectifs d'oiseaux présents, du fait de la dispersion des jeunes ou du début de la migration, pourrait pousser les moustiques à se tourner vers de nouveaux hôtes. Ce scénario est suspecté aux Etats-Unis où la dispersion et la migration d'un hôte privilégié des moustiques vecteurs, le Merle américain *Turdus migratorius*, se produit au moment de la recrudescence des cas cliniques dans la population humaine (Kilpatrick *et al.* 2006b).

Enfin, des **facteurs relatifs aux hôtes sensibles** sont probablement associés à l'apparition de symptômes. En effet, des infections sub-cliniques sont rapportées aussi bien chez l'Homme (Del Giudice *et al.* 2004) que chez le Cheval (Murgue *et al.* 2001b, Durand *et al.* 2002, Castillo-Olivares & Wood 2004, Leblond 2006). Les raisons pour lesquelles certains individus développent des signes cliniques alors que d'autres ne présentent qu'une séroconversion sont mal connues.

Pour résumer, l'émergence de cas cliniques chez l'Homme ou le Cheval en fin d'été est possible si le virus WN est transmis par des moustiques ayant piqué auparavant des oiseaux infectés. L'identification précise de ces espèces d'oiseaux reste à faire mais les espèces proches des habitations humaines et des écuries sont de bonnes candidates. L'analyse des repas sanguins des vecteurs devrait aider à déterminer les espèces impliquées. En outre, une modification des espèces et des effectifs d'oiseaux présents en Camargue en fin d'été et début d'automne (dispersion des jeunes, départ des nicheurs migrateurs, passage des migrateurs au long cours, arrivée des hivernants) pourrait être à l'origine d'un changement de comportement des vecteurs. Il serait donc nécessaire de suivre l'évolution, au cours de l'année, de l'abondance des espèces d'oiseaux qui servent le plus souvent d'hôte aux moustiques vecteurs.

### **3.4 Rôle dans la dissémination**

La dispersion d'un pathogène est souvent étroitement associée à celle des espèces qui lui servent d'hôte (Boulinier *et al.* 2001). Pour le virus WN, on peut ainsi s'attendre à ce que l'expansion d'un foyer primaire d'amplification soit assurée par les déplacements des arthropodes vecteurs ou des hôtes vertébrés.

La dispersion des **arthropodes vecteurs** est assurée activement par le vol ou passivement par le vent et, éventuellement, les moyens de transport humains. Chez les espèces les plus probablement impliquées dans l'amplification du virus WN en Camargue (*Cx. modestus* et *Cx. pipiens*), la dispersion active est considérée comme limitée (Balenghien 2006).

Pour les **oiseaux sauvages**, l'utilisation de l'espace est très variable selon les espèces et, pour une espèce donnée, selon l'âge et la saison. Les oiseaux amplificateurs capables de parcourir des distances importantes au cours d'une journée sont considérés comme de bons candidats à la dissémination du virus WN (Yaremych *et al.* 2004a, Doctrinal *et al.* 2005, Ward *et al.* 2006). Les individus, notamment les jeunes, qui constituent en fin d'été des groupes de grande taille se déplaçant fréquemment, pourraient en particulier permettre une dissémination rapide du virus (Reisen *et al.* 2004). La localisation des sites de repos nocturnes est particulièrement intéressante à connaître car les oiseaux se font principalement piquer pendant la nuit.

En Camargue, lors de l'épizootie de 2000 qui a surtout atteint des chevaux présents en zone sèche (nord-ouest de la Camargue), un transport du virus depuis la zone humide a été suspecté (Durand *et al.* 2002). Plusieurs espèces d'oiseaux potentiellement impliquées dans ce transport ont été proposées dans l'**article 2**. Toutefois, la mise en évidence de moustiques *Cx. modestus* en différents points d'un cours d'eau, situé à proximité d'une écurie infectée en 2000, indique qu'il est aussi possible que le virus WN ait été transporté par ces arthropodes (Balenghien 2006).

Le rôle des oiseaux sauvages dans la dissémination du virus WN en Camargue reste encore mal connu. Pour mieux l'évaluer, deux types d'investigations seraient nécessaires : (1) comparer la nature des espèces servant préférentiellement d'hôtes aux moustiques vecteurs en zone sèche et en zone humide (à partir de l'analyse des repas de sang) ; (2) suivre par télémétrie des espèces candidates à la dissémination afin de connaître précisément les distances parcourues par ces espèces et d'estimer dans quelle mesure elles peuvent participer à la dispersion du virus WN (Yaremych *et al.* 2004a, Ward *et al.* 2006).

### **3.5 Rôle de réservoir**

Un réservoir est un **système écologique**, constitué de populations d'hôtes et/ou de milieux, qui assure la pérennité d'un pathogène, notamment durant les périodes défavorables à la transmission (Rodhain & Perez 1985, Ashford 1997, Rodhain 1998, Haydon *et al.* 2002, Ashford 2003). Pour les arbovirus, le **maintien d'un cycle primaire de transmission**, d'une année à l'autre, peut être expliqué par trois scénarios (Stamm 1966, Reeves 1974, Emord & Morris 1984) : (1) soit le virus est réintroduit chaque année ; (2) soit il existe un site protégé où le cycle de transmission se poursuit pendant la période hivernale ; (3) soit il existe un réservoir assurant la pérennité du virus pendant la saison défavorable à la transmission

vectorielle puis sa remise en circulation au printemps suivant. Concernant la première possibilité, nous avons vu précédemment que l'introduction du virus WN en Camargue par le biais des oiseaux migrateurs est probable mais que les mécanismes et la fréquence de ce phénomène restent inconnus. En revanche, la seconde possibilité est peu probable même si les femelles de *Cx. modestus* peuvent conserver une faible activité hivernale (Mouchet *et al.* 1969, Mouchet *et al.* 1970) ; en effet, la température est en général trop basse en hiver pour permettre une amplification du virus chez les vecteurs.

La persistance du virus WN chez un **réservoir invertébré** (arthropodes vecteurs) est possible s'il y a transmission du virus par une femelle infectée à sa descendance (transmission verticale) ou s'il y a hivernage d'individus infectés (Rodhain 1998). Aux Etats-Unis, la présence du virus WN a été rapportée chez des moustiques vecteurs en période hivernale (Nasci *et al.* 2001, Farajollahi *et al.* 2005a), laissant penser que ces derniers peuvent assurer le maintien du virus même quand le cycle de transmission est interrompu. En Camargue, des tentatives d'isolement du virus WN effectuées en hiver à partir de moustiques *Cx. modestus* sont restées infructueuses (Mouchet *et al.* 1970). Cependant, un autre arbovirus, le virus Tahyna (famille des Bunyaviridae), a été mis en évidence. Il est possible que le virus WN n'ait pas été détecté par manque de sensibilité, le nombre de moustiques testés étant peu élevé. Par ailleurs, les tiques, qui ont une grande longévité et une grande capacité de résistance dans le milieu extérieur (Rodhain 1998), pourraient aussi assurer la persistance du virus d'une année à l'autre.

Les autres réservoirs pouvant maintenir le virus WN pendant la période hivernale sont les **réservoirs vertébrés** (populations d'hôtes) (Rodhain 1998). L'existence d'infections chroniques par le virus WN a été rapportée dans plusieurs modèles animaux (Monath & Heinz 1996, Kuno 2001a, Xiao *et al.* 2001, Tonry *et al.* 2005, Reisen *et al.* 2006b). Une reprise de la réplication virale pourrait ensuite se produire, par exemple lors d'une diminution des défenses immunitaires (Monath & Heinz 1996). Le stress occasionné par la mue, la défense du territoire, l'ovulation, la migration ou l'infection concomitante par un autre pathogène, pourrait être à l'origine d'une recrudescence virale (Reisen 1990, Crans *et al.* 1994). Chez la souris, il a même été montré, avec le virus de la Vallée Cache (famille des Bunyaviridae), que de simples piqûres de moustiques peuvent provoquer la réapparition d'une virémie détectable (Edwards *et al.* 1998). Une fois le virus réactivé, le cycle primaire au sein de l'avifaune pourrait reprendre. La présence au printemps de poussins, naïfs vis-à-vis du virus, pourrait en outre faciliter le redémarrage du cycle de transmission.

Les premières investigations réalisées en laboratoire sur des oiseaux n'ont pas permis de démontrer ce phénomène de recrudescence pour les arbovirus (Reisen *et al.* 2001, Reisen *et al.* 2003a). En revanche, l'existence d'une **réactivation sous l'effet du stress** a été démontrée expérimentalement pour une bactérie du genre *Borrelia*, à l'origine de la maladie de Lyme (Gylfe *et al.* 2000), et pour un protozoaire du genre *Plasmodium*, responsable du paludisme

aviaire (Applegate 1971, Beaudouin & Applegate 1971). Pour Reisen (1990), la réactivation du paludisme aviaire au printemps pourrait elle-même favoriser la recrudescence des arbovirus. Si cette hypothèse est vérifiée, le paludisme aviaire pourrait faciliter la circulation du virus WN en Camargue. En effet, cette maladie y est très fréquente : 95% des pies que nous avons prélevées en 2005 étaient infectées par des plasmodies (Ben Sheldon, E.G.I., données non publiées).

L'existence d'une **transmission non vectorielle**, d'un vertébré à un autre, pourrait également permettre au virus de persister durant l'hiver (Kuno 2001b). Cette hypothèse de transmission est particulièrement pertinente pour les espèces qui vivent en groupe pendant la saison hivernale (Marra *et al.* 2004).

Les mécanismes de persistance du virus WN sont donc encore méconnus. Des investigations sur le terrain et en laboratoire sont nécessaires pour déterminer si les oiseaux, mais aussi les autres vertébrés (amphibiens, reptiles, mammifères), peuvent permettre au virus WN de persister pendant la période hivernale puis de réamorcer un cycle d'amplification au printemps suivant.

### **3.6 Rôle de sentinelle**

On appelle sentinelles des espèces qui servent d'indicateurs biologiques, signalant aux épidémiologistes les périodes d'activité du virus, avant que la phase d'émergence ne soit atteinte (Rodhain 1998). Les qualités requises pour qu'une espèce soit qualifiée de **sentinelle idéale** sont nombreuses (Komar 2001). L'espèce doit pour cela :

- Etre uniformément sensible à l'infection,
- Etre résistante à la maladie,
- Etre facile à échantillonner,
- Développer rapidement une réponse sérologique détectable,
- Présenter une séroconversion avant que les symptômes n'apparaissent dans la population sensible (hommes ou chevaux),
- Présenter une attractivité et une tolérance fortes vis-à-vis des moustiques vecteurs, sans toutefois contribuer aux cycles locaux de transmission virale (pour les sentinelles captives),
- Représenter un risque négligeable pour les personnes qui les manipulent.

Si la sentinelle est une espèce sauvage, elle doit de plus (Artois *et al.* 2003, Peterson *et al.* 2004, Gibbs *et al.* 2006) :

- Etre sédentaire, largement distribuée et présente dans des zones écologiques distinctes,
- Présenter des marqueurs d'infection (en général, des anticorps) détectables par les techniques de laboratoire utilisées en routine,

- Etre facile à capturer et prélever (l'idéal est une espèce nuisible ou chassable fréquemment prélevée, pour laquelle l'obtention de prélèvements nécessite peu d'investissements).

En Camargue, le suivi de la circulation du virus WN repose sur une **surveillance passive**, qui consiste à déclarer aux autorités sanitaires les cas cliniques associés au virus WN chez l'Homme, le Cheval et les oiseaux, et sur une **surveillance active** qui utilise comme sentinelles des oiseaux d'élevage (poules et canards). Des anticorps spécifiques du virus WN sont recherchés chez ces sentinelles une fois par mois, de juillet à octobre, afin de mettre en évidence une éventuelle séroconversion (Hars *et al.* 2005a). En 2001, l'ONCFS a également effectué des captures de pies bavardes mais, la proportion de recaptures étant peu élevée (4 sur 28 individus), le système a été abandonné (Hars *et al.* 2004).

L'intérêt majeur que présente l'utilisation d'**oiseaux sentinelles sauvages** plutôt que captifs est que les oiseaux sauvages sont mobiles, ce qui augmente leur probabilité d'être présents, à un moment ou un autre de la saison, dans un foyer de transmission du virus (Komar 2001). Cette notion de mobilité est toutefois très variable selon les espèces d'oiseaux considérées, et peut s'avérer un inconvénient car la localisation précise du foyer de transmission virale reste inconnue. Par ailleurs, sachant que l'attractivité vis-à-vis des moustiques est un critère important pour qu'une espèce constitue une bonne sentinelle épidémiologique (Reisen *et al.* 1992), certaines espèces sauvages, plus attractives que les poules ou les canards sur les moustiques vecteurs, pourraient avoir une plus forte probabilité de révéler l'existence d'une circulation virale.

Parmi les espèces que nous avons étudiées en Camargue, le Moineau domestique et la Pie bavarde seraient de bons candidats pour être utilisés comme sentinelles. En effet, ils sont fréquents et largement distribués, leurs capture et manipulation sont aisées, ils sont en contact avec le virus puisque des sérologies positives ont été mises en évidence à plusieurs reprises, et leur sérum peut être analysé par un test ELISA indirect. Il est d'ailleurs intéressant de noter que le Moineau domestique est utilisé comme sentinelle aux Etats-Unis pour révéler la circulation d'un autre arbovirus de la famille des Flaviviridae, le virus de l'Encéphalite de Saint Louis (Lord *et al.* 1974, McLean *et al.* 1983).

Néanmoins, les connaissances relatives aux interactions entre les oiseaux sauvages et le virus WN (sensibilité à l'infection, morbidité, mortalité, cinétique des anticorps...) étant très restreintes pour la majorité des espèces d'oiseaux, leur utilisation en tant que sentinelles épidémiologiques est délicate. Ainsi, la durée de persistance des anticorps n'a été décrite que dans un nombre très limité d'espèces (Kuno 2001a, Gibbs *et al.* 2005). Ces études indiquent que des anticorps restent détectables pendant plus d'un an, ce qui signifie qu'un oiseau sauvage présentant une sérologie positive à une date donnée peut révéler une circulation ancienne du virus, comme nous l'avons observé dans notre étude pour les pies bavardes prélevées en 2005 (cf. **chapitre 3**). Par conséquent, comme pour les oiseaux captifs, la

surveillance ne peut s'appuyer que sur la mise en évidence d'une **séroconversion**. Or, même s'il existe des variations en fonction des espèces, les oiseaux sauvages sont difficilement recapturés. Seul un effort de capture très important peut donc permettre de disposer d'un échantillon d'oiseaux suffisamment grand pour espérer mettre en évidence une séroconversion. Une autre possibilité serait de n'inclure dans la population d'étude que les **individus âgés de moins d'un an**. La présence possible d'anticorps maternels chez ces jeunes oiseaux peut toutefois compliquer l'interprétation des résultats (Komar 2001, Jamgaonkar *et al.* 2003, Gibbs *et al.* 2005, Reisen *et al.* 2005b, Stout *et al.* 2005, Hahn *et al.* 2006).

La mise en évidence d'une circulation virale par la **détection du génome viral**, par exemple dans les fientes, pourrait s'avérer pertinente. En effet, contrairement à la sérologie, l'identification directe d'un fragment de génome viral ne s'accompagne pas de problèmes d'interprétation et la technique de laboratoire est indépendante de l'espèce étudiée. Aux Etats-Unis, où l'infection des oiseaux par le virus WN se traduit par une forte mortalité chez certaines espèces d'oiseaux, le système de surveillance s'est donc essentiellement basé sur la mise en évidence du virus WN à partir de prélèvements issus d'oiseaux morts (Eidson *et al.* 2001, Komar 2001, Komar *et al.* 2002, Lindsay *et al.* 2003, Yaremchuk *et al.* 2003, Docherty *et al.* 2004, Stone *et al.* 2004). Si l'excrétion du virus WN dans les fientes s'avère fréquente chez certains oiseaux de Camargue, ceux-ci pourraient alors servir d'indicateurs directs de la circulation virale. Des investigations complémentaires visant à estimer la fréquence de l'excrétion du virus WN dans les fientes, notamment chez les pies bavardes (cf. **chapitre 3**), sont nécessaires pour évaluer l'intérêt éventuel d'un système de surveillance basé sur ce principe.

Il est important de rappeler que la plupart des oiseaux sauvages ont un statut d'espèce protégée et que leur capture et leur manipulation sont soumises à autorisation. De plus, le faible rendement observé lors de la capture d'espèces sauvages fait que le coût associé à l'exploitation d'un système sentinelle utilisant l'avifaune sauvage peut s'avérer bien supérieur à celui du système de surveillance actuellement en vigueur en Camargue. Or, en dépit d'une couverture géographique limitée avec seulement cinq sites d'oiseaux sentinelles captifs par département, celui-ci s'est avéré efficace puisqu'il a permis de détecter la circulation du virus WN en Camargue, d'une part en 2001 et 2002, en l'absence de toute autre manifestation du virus, et d'autre part en 2004, bien avant l'apparition des premiers signes cliniques chez les chevaux (Hars *et al.* 2005a). Le système actuel basé sur l'utilisation d'oiseaux d'élevage sentinelles semble donc suffisant.

### **3.7 Rôle d'hôte sensible**

Alors qu'il était réputé peu pathogène pour les oiseaux sauvages, le virus WN a provoqué une **forte mortalité chez les oiseaux nord-américains** suite à son introduction sur le

continent en 1999, faisant redouter l'extinction de certaines espèces (Komar 2000, Malakoff 2002, Marra *et al.* 2003, Naugle *et al.* 2004, Peterson *et al.* 2004). La forte sensibilité observée chez les oiseaux nord-américains est probablement liée au fait que ces oiseaux n'ont **pas d'histoire co-évolutive** avec le virus WN. En effet, pour de nombreux virus, plus la relation avec les espèces hôtes est ancienne, plus la probabilité pour que le virus entraîne simplement une infection sub-clinique est forte. Au contraire, si la relation est récente, la probabilité pour que le virus provoque une maladie sévère est élevée (Ritchie 1995). Les espèces artificiellement déplacées par l'Homme révèlent l'importance de cette composante génétique dans le maintien d'une circulation virale silencieuse. Ainsi, il a été montré que le Moineau domestique, introduit sur le continent américain pendant la période 1852-1860 (Johnston & Selander 1972), est sensible au virus de l'Encéphalite Equine de l'Est (famille des Togaviridae), un virus spécifique du Nouveau Monde peu pathogène pour les oiseaux nord-américains (Ritchie 1995).

Il est aussi probable que le virus WN introduit aux Etats-Unis appartienne à une **souche particulièrement pathogène** pour les oiseaux. En effet, les différentes souches virales isolées sur le continent américain sont phylogénétiquement très proches de souches associées à des troubles cliniques chez les oiseaux en Israël et en Hongrie (Lanciotti *et al.* 1999, Malkinson *et al.* 2002, Banet-Noach *et al.* 2003a, Bakonyi *et al.* 2006). Cette hypothèse est confortée par une étude d'infection expérimentale, sur des corneilles d'Amérique, qui a montré que la mortalité est significativement plus élevée lors de l'infection par une souche NY99 que par une souche originaire du Kenya (Brault *et al.* 2004). En revanche, la mortalité et la virémie associées à l'infection par ces deux souches se sont avérées similaires lors d'une étude d'infection expérimentale effectuée sur moineaux domestiques (Langevin *et al.* 2005). Ces travaux étant effectués sur des individus sauvages, il serait intéressant d'évaluer si le stress associé à leur captivité et leur manipulation peut engendrer un biais dans les résultats observés.

**En Europe**, aucune mortalité aviaire massive associée au virus WN n'a jamais été rapportée (Zeller & Schuffenecker 2004). En France, le programme de surveillance passive du virus WN basé sur la collecte d'oiseaux trouvés morts (réseau SAGIR) n'a permis d'identifier aucun oiseau positif en RT-PCR ou Nested-PCR (Hars *et al.* 2005a). Nous avons été plus chanceux puisque nous avons pu isoler le virus WN à partir de biopsies de cerveaux prélevées sur deux oiseaux morts (un Moineau domestique et une Pie bavarde). Aucun examen anatomopathologique n'a été effectué sur ces oiseaux mais le fort titre viral observé dans les échantillons indique que le virus WN est probablement à l'origine de leur mort. Il est donc possible qu'une **mortalité modérée** associée au virus WN existe dans la population d'oiseaux sauvages de Camargue, mais passe inaperçue car la probabilité de détection des oiseaux morts dans l'environnement est très faible, en particulier pour les espèces de petite taille (Wobeser & Wobeser 1992, Philibert *et al.* 1993).

## 4. Conclusion et perspectives

La contribution des différentes espèces d'oiseaux à la circulation du virus WN est difficile à analyser en raison de la complexité du cycle de transmission. Nos investigations en Camargue ont permis de clarifier la situation épidémiologique observée mais de nombreuses recherches sont encore nécessaires pour parvenir à comprendre les interactions mises en jeu dans l'introduction, la transmission et la pérennisation du virus dans cette région.

Les principaux moustiques vecteurs du virus WN ayant récemment été identifiés (Balenghien 2006), il sera possible, en étudiant les repas de sang de ces moustiques, de déterminer quelles sont les espèces d'oiseaux les plus fréquemment exposées à des piqûres infectantes. Ces espèces devront ensuite faire l'objet d'infections expérimentales visant à évaluer leur compétence d'hôte et à décrire les interactions hôte-virus sur le court et le long terme. L'influence de facteurs tels que l'âge ou le stress pourra en outre être testée.

Une meilleure connaissance de la répartition spatio-temporelle des oiseaux de Camargue sera par ailleurs nécessaire pour parvenir à comprendre la dynamique de transmission et de dispersion du virus WN. Un suivi spécifique des espèces fréquemment piquées par les moustiques vecteurs devra être effectué. Ces données seront essentielles pour parvenir à modéliser la circulation du virus WN et anticiper son émergence chez les hôtes sensibles.





---

# ***BIBLIOGRAPHIE***

---



- Abbassy M.M., Osman M., Marzouk A.S. West Nile virus (Flaviviridae: *Flavivirus*) in experimentally infected Argas ticks (Acari: Argasidae). *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48: 726-37.
- Alerstam T. *Bird migration*. Translated by Christie, D. A. Cambridge: Cambridge University Press; 1990.
- Alerstam T. Bird migration speed. In: Berthold P., Gwinner E. and Sonnenschein E. eds. *Avian migration*. Berlin: Springer-Verlag; 2003: 253-67.
- Anderson J.F., Andreadis T.G., Vossbrinck C.R., Tirrell S., Wakem E.M., French R.A., Garmendia A.E., Van Kruiningen H.J. Isolation of West Nile virus from mosquitoes, crows, and a Cooper's hawk in Connecticut. *Science* 1999; 286: 2331-3.
- Anderson J.F., Main A.J., Andreadis T.G., Wikel S.K., Vossbrinck C.R. Transstadial transfer of West Nile virus by three species of ixodid ticks (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 2003; 40: 528-33.
- Anderson J.F., Andreadis T.G., Main A.J., Kline D.L. Prevalence of West Nile virus in tree canopy-inhabiting *Culex pipiens* and associated mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71: 112-9.
- Anonyme. Getting out into the field, and forest. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 127.
- Apperson C.S., Harrison B.A., Unnasch T.R., Hassan H.K., Irby W.S., Savage H.M., Aspen S.E., Watson D.W., Rueda L.M., Engber B.R., Nasci R.S. Host-feeding habits of *Culex* and other mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the Borough of Queens in New York City, with characters and techniques for identification of *Culex* mosquitoes. *J Med Entomol* 2002; 39: 777-85.
- Apperson C.S., Hassan H.K., Harrison B.A., Savage H.M., Aspen S.E., Farajollahi A., Crans W., Daniels T.J., Falco R.C., Benedict M., Anderson M., McMillen L., Unnasch T.R. Host feeding patterns of established and potential mosquito vectors of West Nile virus in the eastern United States. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2004; 4: 71-82.
- Applegate J.E. Spring relapse of *Plasmodium relictum* infections in an experimental field population of English sparrows (*Passer domesticus*). *J Wildl Dis* 1971; 7: 37-42.
- Artois M., Fromont E., Hars J. La faune sauvage, indicateur possible du risque de maladie émergente ? *Epidémiol et santé anim* 2003; 44: 21-31.
- Ashford R.W. What it takes to be a reservoir host. *Belgian Journal of Zoology* 1997; 127: 85-90.
- Ashford R.W. When is a reservoir not a reservoir? *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 1495-6.
- ASPC (Agence de Santé Publique du Canada) *Virus du Nil occidental*. Consulté le : 23/10/06. Accessible en ligne : [http://www.phac-aspc.gc.ca/wnv-vwn/index\\_f.html](http://www.phac-aspc.gc.ca/wnv-vwn/index_f.html)
- Austgen L.E., Bowen R.A., Bunning M.L., Davis B.S., Mitchell C.J., Chang G.J. Experimental infection of cats and dogs with West Nile virus. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 82-6.
- Austin R.J., Whiting T.L., Anderson R.A., Drebot M.A. An outbreak of West Nile virus-associated disease in domestic geese (*Anser anser domesticus*) upon initial introduction to a geographic region, with evidence of bird to bird transmission. *Can Vet J* 2004; 45: 117-23.
- Bakonyi T., Ivanics E., Erdélyi K., Ursu K., Ferenczi E., Weissenböck H., Nowotny N. Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, Central Europe. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 618-23.
- Balenghien T. *De l'identification des vecteurs du virus West Nile à la modélisation du risque d'infection dans le sud de la France*. Thèse. Ecole Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement. Université Joseph Fourier, Grenoble; 2006: 223.
- Balenghien T., Fouque F., Sabatier P., Bicout D.J. Horse, bird and human-seeking behavior and seasonal abundance of mosquitoes in a West Nile focus of southern France. *J Med Entomol* 2006; 43: 936-46.
- Banet-Noach C., Malkinson M., Brill A., Samina I., Yadin H., Weisman Y., Pokamunski S., King R., Deubel V., Stram Y. Phylogenetic relationships of West Nile viruses isolated from birds and horses in Israel from 1997 to 2001. *Virus Genes* 2003a; 26: 135-41.

- Banet-Noach C., Simanov L., Malkinson M. Direct (non-vector) transmission of West Nile virus in geese. *Avian Pathol* 2003b; 32: 489-94.
- Banet-Noach C., Gantz A.Y., Lublin A., Malkinson M. A twelve-month study of West Nile virus antibodies in a resident and a migrant species of kestrels in Israel. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2004; 4: 15-22.
- Bardot P. *Occupation de l'espace par la Pie bavarde (Pica pica) et la Corneille noire (Corvus corone) et leur reproduction en zones humides : l'exemple des marais du Vigueirat, en Camargue*. Mémoire de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes. Laboratoire de Biogéographie et Ecologie des Vertébrés. Université Montpellier II, Montpellier; 2001: 134.
- Beaudouin R.L., Applegate J.E. A model for the ecology of avian malaria. *J Wildl Dis* 1971; 7: 5-13.
- Berezin V.V. *Investigation of the ecology of arboviruses in river deltas of the Caspian and Azov Sea basins*. Inst Polio Virus Entsef Akad Med Nauk SSSR, Moskva; 1971: 37. (RUSS., ENG. TRANSL.).
- Bernard K.A., Maffei J.G., Jones S.A., Kauffman E.B., Ebel G., Dupuis A.P., 2nd, Ngo K.A., Nicholas D.C., Young D.M., Shi P.Y., Kulasekera V.L., Eidson M., White D.J., Stone W.B., Kramer L.D. West Nile virus infection in birds and mosquitoes, New York State, 2000. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 679-85.
- Berthold P., Gwinner E., Sonnenschein E. *Avian migration*. Berlin: Springer-Verlag; 2003.
- Bibby C.J., Burgess N.D., Hill D.A., Mustoe S.H. *Bird census techniques*. London: Academic Press; 2000.
- Bicout D., Leblond A., Heng M.A., Durand B., Zientara S., Durand J.P., Sabatier P. *Analysis of seroprevalence in horses in an endemic area of West Nile disease, Camargue, France*. In: *Xth Congress of the International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics*, Vina del Mar, Chile, 2003.
- Bigot L. Le comportement alimentaire et les biotopes d'alimentation de la Pie (*Pica pica*) en Camargue. *Revue d'écologie. La terre et la vie* 1966; 22: 295-315.
- Blitvich B.J., Bowen R.A., Marlenee N.L., Hall R.A., Bunning M.L., Beaty B.J. Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assays for detection of West Nile virus antibodies in domestic mammals. *J Clin Microbiol* 2003a; 41: 2676-9.
- Blitvich B.J., Marlenee N.L., Hall R.A., Calisher C.H., Bowen R.A., Roehrig J.T., Komar N., Langevin S.A., Beaty B.J. Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of serum antibodies to West Nile virus in multiple avian species. *J Clin Microbiol* 2003b; 41: 1041-7.
- Blondel J., Isenmann P. *Guide des oiseaux de Camargue*. Neuchâtel-Paris: Delachaux & Niestlé; 1981.
- Bond J.O., Lewis F.Y., Jennings W.L., MacLeod I.E. Transovarian transmission of hemagglutination-inhibition antibody to St. Louis Encephalitis virus in chickens. *Am J Trop Med Hyg* 1965; 14: 1085-9.
- Boulinier T., McKoy K.D., Sorci G. Dispersal and parasitism. In: Clobert J., Danchin E., Dhondt A.A. and Nichols J.D. eds. *Dispersal*. Oxford: Oxford University Press; 2001: 169-79.
- Brault A.C., Langevin S.A., Bowen R.A., Panella N.A., Biggerstaff B.J., Miller B.R., Nicholas K. Differential virulence of West Nile strains for American crows. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 2161-8.
- Britten M.W., Kennedy P.L., Ambrose S. Performance and accuracy evaluation of small satellite transmitters. *J Wildl Manage* 1999; 63: 1349-58.

- Buckley A., Dawson A., Moss S.R., Hinsley S.A., Bellamy P.E., Gould E.A. Serological evidence of West Nile virus, Usutu virus and Sindbis virus infection of birds in the UK. *J Gen Virol* 2003; 84: 2807-17.
- Buescher E.L., Scherer W.F., Rosenberg M.Z., Kutner L.J., Mc C.H. Immunologic studies of Japanese encephalitis virus in Japan. IV. Maternal antibody in birds. *J Immunol* 1959; 83: 614-9.
- Bunning M.L., Bowen R.A., Cropp C.B., Sullivan K.G., Davis B.S., Komar N., Godsey M.S., Baker D., Hettler D.L., Holmes D.A., Biggerstaff B.J., Mitchell C.J. Experimental infection of horses with West Nile virus. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 380-6.
- Campbell G.L., Ceianu C.S., Savage H.M. Epidemic West Nile encephalitis in Romania: waiting for history to repeat itself. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 951: 94-101.
- Castillo-Olivares J., Wood J. West Nile virus infection of horses. *Vet Res* 2004; 35: 467-83.
- CDC. (Center for Disease Control) Update: West Nile-like viral encephalitis - New York, 1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1999; 48: 890-2.
- CDC. (Center for Disease Control) *West Nile virus. Statistics, surveillance, and control*. Consulté le: 23/10/06. Accessible en ligne: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/surv&control.htm>
- Charrel R.N., Brault A.C., Gallian P., Lemasson J.J., Murgue B., Murri S., Pastorino B., Zeller H., de Chesse R., de Micco P., de Lamballerie X. Evolutionary relationship between Old World West Nile virus strains. Evidence for viral gene flow between Africa, the Middle East, and Europe. *Virology* 2003; 315: 381-8.
- Chiles R.E., Reisen W.K. A new enzyme immunoassay to detect antibodies to arboviruses in the blood of wild birds. *J Vector Ecology* 1998; 23: 123-35.
- Chippaux A., Chippaux-Hyppolite C., Diederich M., Decoux M. Contribution à l'étude d'un réservoir de virus animal dans le cycle de certains arbovirus en Centrafrique. *Bull Soc Pathol Exot* 1970; 63: 173-80.
- Chomel B.B. New emerging zoonoses: a challenge and an opportunity for the veterinary profession. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1998; 21: 1-14.
- Chunikhin S.P. Analysis of trophic associations between arboviruses and birds. *Sborn. Trud. Ekol. Virus* 1973; 1: 23-26.
- Cleaveland S., Laurenson M.K., Taylor L.H. Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001; 356: 991-9.
- Comstedt P., Bergström S., Olsen B., Garpmo U., Marjavaara L., Mejlon H., Barbour A.G., Bunikis J. Migratory passerine birds as reservoirs of Lyme borreliosis in Europe. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 1087-95.
- Cramp S., Perrins C.M., Brook D.J. *Handbook of the birds of Europe, the Middle East and North Africa. The birds of Western Palearctic. Volume VIII: Crows to Finches*. Oxford: Oxford University Press; 1994.
- Crans W.J., Caccamise D.F., McNelly J.R. Eastern equine encephalomyelitis virus in relation to the avian community of a coastal cedar swamp. *J Med Entomol* 1994; 31: 711-28.
- Darbro J.M., Harrington L.C. Bird-baited traps for surveillance of West Nile mosquito vectors: effect of bird species, trap height, and mosquito escape rates. *J Med Entomol* 2006; 43: 83-92.
- Daszak P., Cunningham A.A., Hyatt A.D. Emerging infectious diseases of wildlife: threats to biodiversity and human health. *Science* 2000; 287: 443-9.
- Deardorff E., Estrada-Franco J., Brault A.C., Navarro-Lopez R., Campomanes-Cortes A., Paz-Ramirez P., Solis-Hernandez M., Ramey W.N., Davis C.T., Beasley D.W., Tesh R.B., Barrett

- A.D., Weaver S.C. Introductions of West Nile virus strains to Mexico. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 314-8.
- Deegan C.S., Burns J.E., Huguenin M., Steinhaus E.Y., Panella N.A., Beckett S., Komar N. Sentinel pigeon surveillance for West Nile virus by using lard-can traps at differing elevations and canopy cover classes. *J Med Entomol* 2005; 42: 1039-44.
- Del Giudice P., Schuffenecker I., Vandenbos F., Counillon E., Zeller H. Human West Nile virus, France. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 1885-6.
- Dobson A., Foufopoulos J. Emerging infectious pathogens of wildlife. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001; 356: 1001-12.
- Docherty D.E., Long R.R., Griffin K.M., Saito E.K. Corvidae feather pulp and West Nile virus detection. *Emerg Infect Dis* 2004; 10.
- Doctrinal D., Bicout D., Gauthier-Clerc M., Artois M., Sandoz A., Sabatier P. Rôle des oiseaux dans l'écologie de la fièvre du Nil occidental : exemple du Héron gardeboeuf en Camargue. *Environnement, Risques et Santé* 2005; 4: 101-8.
- Dohm D.J., O'Guinn M.L., Turell M.J. Effect of environmental temperature on the ability of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile virus. *J Med Entomol* 2002; 39: 221-5.
- Durand B., Chevalier V., Pouillot R., Labie J., Marendat I., Murgue B., Zeller H., Zientara S. West Nile virus outbreak in horses, southern France, 2000: results of a serosurvey. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 777-82.
- Ebel G.D., Dupuis A.P., Nicholas D., Young D., Maffei J., Kramer L.D. Detection by enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies to West Nile virus in birds. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 979-82.
- Edman J.D., Taylor D.J. *Culex nigripalpus*: seasonal shift in the bird-mammal feeding ratio in a mosquito vector of human encephalitis. *Science* 1968; 161: 67-8.
- Edman J.D., Kale H.W., 2nd. Host behavior: its influence on the feeding success of mosquitoes. *Annals of the Entomological Society of America* 1970; 64: 513-6.
- Edman J.D., Webber L.A., Kale H.W., 2nd. Effect of mosquito density on the interrelationship of host behavior and mosquito feeding success. *Am J Trop Med Hyg* 1972; 21: 487-91.
- Edwards J.F., Higgs S., Beaty B.J. Mosquito feeding-induced enhancement of Cache Valley Virus (Bunyaviridae) infection in mice. *J Med Entomol* 1998; 35: 261-5.
- Eidson M., Komar N., Sorhage F., Nelson R., Talbot T., Mostashari F., McLean R. Crow deaths as a sentinel surveillance system for West Nile virus in the northeastern United States, 1999. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 615-20.
- Eldridge B.F. The epidemiology of arthropodborne diseases. In: Eldridge B.F. and Edman J.D. eds. *Medical entomology. A text book on public health and veterinary problems caused by arthropods*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2000: 165-85.
- Eldridge B.F., Scott T., Day J.F., Tabachnick W.J. Arbovirus diseases. In: Eldridge B.F. and Edman J.D. eds. *Medical entomology. A text book on public health and veterinary problems caused by arthropod*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2000: 415-60.
- Emord D.E., Morris C.D. Epizootiology of eastern equine encephalomyelitis virus in upstate New York, USA. VI. Antibody prevalence in wild birds during an interepizootic period. *J Med Entomol* 1984; 21: 395-404.
- Ernek E., Nosek J., Kozuch O. Ticks as vectors of arboviruses in birds in Czechoslovakia. *Wiad Parazytol* 1972; 18: 571-6.
- Ezenwa V.O., Godsey M.S., King R., Guptill S.C. Avian diversity and West Nile virus: testing associations between biodiversity and infectious disease risk. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 2005.

- Farajollahi A., Crans W.J., Bryant P., Wolf B., Burkhalter K.L., Godsey M.S., Aspen S.E., Nasci R.S. Detection of West Nile viral RNA from an overwintering pool of *Culex pipens pipiens* (Diptera: Culicidae) in New Jersey, 2003. *J Med Entomol* 2005a; 42: 490-4.
- Farajollahi A., Crans W.J., Nickerson D., Bryant P., Wolf B., Glaser A., Andreadis T.G. Detection of West Nile virus RNA from the louse fly *Icosta americana* (Diptera: Hippoboscidae). *J Am Mosq Control Assoc* 2005b; 21: 474-6.
- Farfan-Ale J.A., Blitvich B.J., Lorono-Pino M.A., Marlenee N.L., Rosado-Paredes E.P., Garcia-Rejon J.E., Flores-Flores L.F., Chulim-Perera L., Lopez-Uribe M., Perez-Mendoza G., Sanchez-Herrera I., Santamaria W., Moo-Huchim J., Gubler D.J., Cropp B.C., Calisher C.H., Beaty B.J. Longitudinal studies of West Nile virus infection in avians, Yucatan state, Mexico. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2004; 4: 3-14.
- Friend M., McLean R.G., Dein F.J. Disease emergence in birds: challenges for the twenty-first century. *The Auk* 2001; 118: 290-303.
- Fuller M.R., Seegar W.S., Howey P.W. The use of satellite systems for the study of bird migration. *Israel J Zool* 1995; 41: 243-52.
- Gancz A.Y., Barker I.K., Lindsay R., Dibernardo A., McKeever K., Hunter B. *A West Nile outbreak in North American owls*. In: *8th European Association of Avian Veterinarians Conference*, Arles, France, 2005.
- Gardner I.A., Hietala S., Boyce W.M. Validity of using serological tests for diagnosis of diseases in wild animals. *Rev Sci Tech OIE* 1996; 15: 323-35.
- Garmendia A.E., Van Kruiningen H.J., French R.A., Anderson J.F., Andreadis T.G., Kumar A., West A.B. Recovery and identification of West Nile virus from a hawk in winter. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3110-1.
- Gasparini J., McKoy K.D., Tveraa T., Boulinier T. Related concentrations of specific immunoglobulins against the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* sensu lato in eggs, young and adults of the kittiwake (*Rissa tridactyla*). *Ecology letters* 2002; 5: 519-24.
- Gauthier-Clerc M., Le Maho Y. Beyond bird marking with rings. *Ardea* 2001; 89: 221-30.
- Gibbs S.E., Hoffman D.M., Stark L.M., Marlenee N.L., Blitvich B.J., Beaty B.J., Stallknecht D.E. Persistence of antibodies to West Nile virus in naturally infected rock pigeons (*Columba livia*). *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12: 665-7.
- Gibbs S.E., Allison A.B., Yabsley M.J., Mead D.G., Wilcox B.R., Stallknecht D.E. West Nile virus antibodies in avian species of Georgia, USA: 2000-2004. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2006; 6: 57-72.
- Godsey M.S., Jr., Blackmore M.S., Panella N.A., Burkhalter K., Gottfried K., Halsey L.A., Rutledge R., Langevin S.A., Gates R., Lamonte K.M., Lambert A., Lanciotti R.S., Blackmore C.G., Loyless T., Stark L., Oliveri R., Conti L., Komar N. West Nile virus epizootiology in the southeastern United States, 2001. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2005; 5: 82-9.
- Goodwin D. *Crows of the world*. Bury St Edmunds, Suffolk: St Edmunds Press Ltd; 1986.
- Gordeeva Z.E. Population immunity of humans, wild and domestic animals, and birds to Issyk Kul, West Nile, and Sindbis viruses in Tadzhikistan. *Sborn. Nauch. Trus. Inst. Virus* 1982; 132-4.
- Grindstaff J.L., Brodie III E.D., Ketterson E.D. Immune function across generations: integrating mechanism and evolutionary process in maternal antibody transmission. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 2003; 270: 2309-19.
- Guy J.S., Malkinson M. Arbovirus infections. In: Saif Y.M. ed. *Diseases of poultry*. Ames, Iowa: Iowa State University Press; 2003: 388-98.
- Gylfe A., Bergstrom S., Lundstrom J., Olsen B. Reactivation of *Borrelia* infection in birds. *Nature* 2000; 403: 724-5.



- Hafner H., Pineau O., Kayser Y., Poulin B., Lefebvre G. Les ardéidés, hérons, aigrettes et butors, en Camargue. In: Isenmann P. ed. *Les oiseaux de Camargue et leurs habitats : une histoire de cinquante ans 1954-2004*. Tours: Buchet/Chastel (Ecologie); 2004: 57-120.
- Hahn D.C., Nemeth N.M., Edwards E., Bright P.R., Komar N. Passive West Nile virus antibody transfer from maternal Eastern Screech-Owls (*Megascops asio*) to progeny. *Avian Dis* 2006; 50: 454-5.
- Hall R.A., Broom A.K., Hartnett A.C., Howard M.J., Mackenzie J.S. Immunodominant epitopes on the NS1 protein of MVE and KUN viruses serve as targets for a blocking ELISA to detect virus-specific antibodies in sentinel animal serum. *J Virol Methods* 1995; 51: 201-10.
- Hannoun C., Panthier R., Mouchet J., Eouzan J.P. Isolement en France du virus West Nile à partir de malades et du vecteur *Culex modestus Ficalbi*. *C. R. Acad. Sc. Paris* 1964; 259: 4170-4172.
- Hannoun C., Joubert L., Oudar J. Etude épidémiologique des arboviroses en Camargue. Enquête sérologique chez le cheval. *Bull Soc Sci Vét* 1965; 66: 71-102.
- Hannoun C., Corniou B., Mouchet J. Role of migrating birds in arbovirus transfer between Africa and Europe. In: Cherepanov, A, ed. *Transcontinental connections of migratory birds and their role in the distribution of arboviruses*. Novosibirsk: Nauka; 1972: 167-72.
- Hars J., Augé P., Chavernac D., Balença G., Keck N., Pradel J., Zeller H.G. Surveillance de l'infection de l'avifaune camarguaise par le virus West Nile. *Faune sauvage* 2004; 261: 54-8.
- Hars J., Augé P., Pradel J., Mortamais M., Chavernac D., Balença G., Zientara S., Schuffenecker I., Zeller H.G. *Surveillance of West Nile virus in the avifauna of Southern France*. In: *8th European Association of Avian Veterinarians Conference*, Arles, France, 2005a.
- Hars J., Mortamais M., Augé P., Baldet T., Chavernac D., Gaillet J.R., Gaudin J.C., Languille J., Terrier M.E., Schuffenecker I., Zeller H. *Programme de surveillance de l'infection de l'avifaune française par le virus West Nile en 2005*. ONCFS, Gières; 2005b: 21.
- Hassan H.K., Cupp E.W., Hill G.E., Katholi C.R., Klingler K., Unnasch T.R. Avian host preference by vectors of eastern equine encephalomyelitis virus. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 69: 641-7.
- Haydon D.T., Cleaveland S., Taylor L.H., Laurenson M.K. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 1468-73.
- Hayes C.G. West Nile fever. In: Monath T.P. ed. *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*. FL: CRC Press. Boca Raton; 1989: 59-88.
- Higgs S., Schneider B.S., Vanlandingham D.L., Klingler K.A., Gould E.A. Nonviremic transmission of West Nile virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 8871-4.
- Hoffmann L. Premier compte rendu : 1950-1954. Appendice 1 : baguements et reprises. *Station Biologique de la Tour du Valat. Compte-rendu et recueil des travaux* 1955; 1: 13-36.
- Hoffmann L. Deuxième compte rendu : 1955. Appendice 1 : baguements et reprises. *Station Biologique de la Tour du Valat. Compte-rendu et recueil des travaux* 1956; 2: 11-32.
- Hoffmann L., Leveque R. Troisième compte rendu : 1956. Appendice 1 : baguements et reprises. *Station Biologique de la Tour du Valat. Compte-rendu et recueil des travaux* 1957; 3: 10-48.
- Hoffmann L. Station de baguage de Camargue. Compte rendu pour l'année 1957. *Terre et vie* 1959; 13: 83-103.
- Hoffmann L. Station de baguage de Camargue. Compte rendu pour l'année 1958. *Terre et vie* 1960; 14: 81-108.
- Hoffmann L. Station de baguage de Camargue. Compte rendu pour l'année 1959. *Revue d'Ecologie (Terre et Vie)* 1962; 16: 34-65.
- Hoffmann L. Station de baguage de Camargue. Compte rendu pour les années 1960 et 1961. *Revue d'Ecologie (Terre et Vie)* 1963; 17: 289-97.

- Hoffmann L. Station de baguage de Camargue. Compte rendu pour les années 1962 et 1963. *Revue d'Ecologie (Terre et Vie)* 1964; 18: 334-49.
- Hoffmann L. Station de baguage de Camargue. Compte rendu pour les années 1964 et 1965. *Revue d'Ecologie (Terre et Vie)* 1966; 20: 259-70.
- Hoffmann L. Station de baguage de Camargue. Compte rendu pour les années 1966 et 1967. *Revue d'Ecologie (Terre et Vie)* 1968; 22: 500-13.
- Hoffmann L. Station de baguage de Camargue. Compte rendu pour les années 1968 et 1969. *Revue d'Ecologie (Terre et Vie)* 1970; 24: 604-18.
- Holden P., Francy D.B., Mitchell C.J., Hayes R.O., Lazwick J.S., Hughes T.B. House sparrows, *Passer domesticus* (L.), as hosts of arboviruses in Hale County, Texas. II. Laboratory studies with Western equine encephalitis virus. *Am J Trop Med Hyg* 1973; 22: 254-62.
- Howey P.W. Tracking of birds by satellite. In: Priede, IG and Swift, SS, ed. *Wildlife telemetry. Remote monitoring and tracking of animals*. New York: Ellis Horwood; 1992: 177-84.
- Hubalek Z., Halouzka J. West Nile fever - a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 643-50.
- Hubalek Z., Savage H.M., Halouzka J., Juricova Z., Sanogo Y.O., Lusk S. West Nile virus investigations in South Moravia, Czechland. *Viral Immunol* 2000; 13: 427-33.
- Hubalek Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. *J Wildl Dis* 2004; 40: 639-59.
- Hull J., Hull A., Reisen W., Fang Y., Ernest H. Variation of West Nile virus antibody prevalence in migrating and wintering hawks in central California. *The Condor* 2006; 108: 435-9.
- Hurlbut H.S. West Nile virus infection in arthropods. *Am J Trop Med Hyg* 1956; 5: 76-85.
- Hutcheson H.J., Gorham C.H., Machain-Williams C., Lorono-Pino M.A., James A.M., Marlenee N.L., Winn B., Beaty B.J., Blair C.D. Experimental transmission of West Nile virus (Flaviviridae: *Flavivirus*) by *Carios capensis* ticks from North America. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2005; 5: 293-5.
- Isenmann P. *Les oiseaux de Camargue et leurs habitats: une histoire de cinquante ans 1954-2004*. Paris: Buchet-Chastel; 2004.
- Jacobson R.H. Validation des épreuves sérologiques pour le diagnostic des maladies infectieuses. *Rev Sci Tech OIE* 1998; 17: 487-506.
- Jacquat M.S. La migration des oiseaux. *Nos oiseaux* 1999; 46: 145-52.
- Jamgaonkar A.V., Yergolkar P.N., Geevarghese G., Joshi G.D., Joshi M.V., Mishra A.C. Serological evidence for Japanese encephalitis virus and West Nile virus infections in water frequenting and terrestrial wild birds in Kolar District, Karnataka State, India. A retrospective study. *Acta Virol* 2003; 47: 185-8.
- Janovy J. Protozoa, helminths, and arthropods of birds. In: Clayton, DH and Moore, J, ed. *Host-parasite evolution: general principles and avian models*. Oxford: Oxford University Press; 1997: 303-337.
- Johnson A. Station de baguage de Camargue. Compte rendu pour les années 1970 et 1971. *Revue d'Ecologie (Terre et Vie)* 1973; 27: 102-17.
- Johnson A. Station de baguage de Camargue. Compte rendu pour les années 1972 et 1973. *Revue d'Ecologie (Terre et Vie)* 1975a; 29: 116-30.
- Johnson A. Station de baguage de Camargue. Compte rendu pour les années 1974 et 1975. *C R Activité de la Station Biologique de la Tour du Valat* 1975b; 21-22: 28-34.

- Johnson A., Barbraud C. Le Flamant rose en Camargue. In: Isenmann P. ed. *Les oiseaux de Camargue et leurs habitats : une histoire de cinquante ans 1954-2004*. Tours: Buchet/Chastel (Ecologie); 2004.
- Johnston R.F., Selander R.K. Variation, adaptation, and evolution in the North American House Sparrows. In: Kendeigh S.C. and Pinowski J. eds. *Productivity, population dynamics and systematics of granivorous birds. Proceedings of general meeting of the working group on granivorous birds, IBP, PT section, The Hague, Holland, September 6-8 1970*. Warszawa; 1972: 301-26.
- Joubert L., Oudar J., Hannoun C., Chippaux M. Reproduction expérimentale de la méningo-encéphalite du cheval par l'arbovirus West Nile. III. Relations entre la virologie, la sérologie et l'évolution anatomo-clinique. Conséquences épidémiologiques et prophylactiques. *Bull Acad Vét* 1971; 44: 159-67.
- Jourdain, E, Toussaint, Y, Leblond, A, Bicout, DJ et al. Bird species potentially involved in introduction, amplification and spread of West Nile virus in a Mediterranean wetland, the Camargue (southern France). *Vector Borne Zoonotic Dis* 2007; in press.
- Joyner P.H., Kelly S., Shreve A.A., Snead S.E., Sleeman J.M., Pettit D.A. West Nile virus in raptors from Virginia during 2003: clinical, diagnostic, and epidemiologic findings. *J Wildl Dis* 2006; 42: 335-44.
- Jozan M., Evans R., McLean R., Hall R., Tangredi B., Reed L., Scott J. Detection of West Nile Virus infection in birds in the United States by blocking ELISA and immunohistochemistry. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2003; 3: 99-110.
- Juricova Z., Hubalek Z., Halouzka J., Hudec K., Pellantova J. Results of arbovirological examination of birds of the family Hirundinidae in Czechoslovakia. *Folia Parasitol (Praha)* 1989; 36: 379-83.
- Juricova Z., Pinowski J., Literak I., Hahm K.H., Romanowski J. Antibodies to alphavirus, flavivirus, and bunyavirus arboviruses in house sparrows (*Passer domesticus*) and tree sparrows (*P. montanus*) in Poland. *Avian Dis* 1998; 42: 182-5.
- Kaiser M.N., Hoogstraal H. Ticks (Ixodidae) on migrating birds in Cyprus, fall 1967 and spring 1968, and epidemiological considerations. *Bull ent Res* 1974; 64: 97-110.
- Karesh W.B., Cook R.A., Bennett E.L., Newcomb J. Wildlife trade and global disease emergence. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1000-2.
- Kayser Y., Girard C., Massez G., Chérain Y., Cohez D., Hafner H., Johnson A., Sadoul N., Tamisier A., Isenmann P. Compte-rendu ornithologique camarguais pour les années 1995-2000. *Revue d'Ecologie (Terre & Vie)* 2003; 58: 5-76.
- Kilpatrick A.M., Daszak P., Jones M.J., Marra P.P., Kramer L.D. Host heterogeneity dominates West Nile virus transmission. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 2006a; 273: 2327-33.
- Kilpatrick A.M., Kramer L.D., Jones M.J., Marra P.P., Daszak P. West Nile virus epidemics in North America are driven by shifts in mosquito feeding behavior. *PLoS Biol* 2006b; 4: e82.
- Kissling R.E., Eidson M.E., Stamm D.D. Transfer of maternal neutralizing antibodies against eastern equine encephalomyelitis virus in birds. *J Infect Dis* 1954; 95: 179-81.
- Klenk K., Komar N. Poor replication of West Nile virus (New York 1999 strain) in three reptilian and one amphibian species. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 69: 260-2.
- Klenk K., Snow J., Morgan K., Bowen R., Stephens M., Foster F., Gordy P., Beckett S., Komar N., Gubler D., Bunning M. Alligators as West Nile virus amplifiers. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 2150-5.
- Kolman J.M., Folk C., Hudec K., Reddy G.N. Serologic examination of birds from the area of southern Moravia for the presence of antibodies against arboviruses of the groups Alfa, Flavo,

- Uukuniemi, Turlock and Bunyamwera supergroup. II. Wild living birds. *Folia Parasitol (Praha)* 1976; 23: 251-5.
- Komar N., Dohm D.J., Turell M.J., Spielman A. Eastern equine encephalitis virus in birds: relative competence of European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60: 387-91.
- Komar N. West Nile viral encephalitis. *Rev Sci Tech* 2000; 19: 166-76.
- Komar N., Davis B., Bunning M., Hettler D. Experimental infection of wild birds with West Nile virus (New York 1999 strain). *Am J Trop Med Hyg* 2000; 62 (suppl 3): 229-30.
- Komar N. West Nile virus surveillance using sentinel birds. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 951: 58-73.
- Komar N., Panella N.A., Burns J.E., Dusza S.W., Mascarenhas T.M., Talbot T.O. Serologic evidence for West Nile virus infection in birds in the New York city vicinity during an outbreak in 1999. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 621-25.
- Komar N., Lanciotti R., Bowen R., Langevin S., Bunning M. Detection of West Nile virus in oral and cloacal swabs collected from bird carcasses. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 741-2.
- Komar N., Langevin S., Hinten S., Nemeth N., Edwards E., Hettler D., Davis B., Bowen R., Bunning M. Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerg Infect Dis* 2003a; 9: 311-22.
- Komar N., Panella N.A., Langevin S.A., Brault A.C., Amador M., Edwards E., Owen J.C. Avian hosts for West Nile virus in St. Tammany Parish, Louisiana, 2002. *Am J Trop Med Hyg* 2005a; 73: 1031-7.
- Komar O., Robbins M.B., Klenk K., Blitvich B.J., Marlenee N.L., Burkhalter K.L., Gubler D.J., Gonzalez G., Pena C.J., Peterson A.T., Komar N. West Nile virus transmission in resident birds, Dominican Republic. *Emerg Infect Dis* 2003b; 9: 1299-302.
- Komar O., Robbins M.B., Contreras G.G., Benz B.W., Klenk K., Blitvich B.J., Marlenee N.L., Burkhalter K.L., Beckett S., Gonzalez G., Pena C.J., Peterson A.T., Komar N. West Nile virus survey of birds and mosquitoes in the Dominican Republic. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2005b; 5: 120-6.
- Kuno G. Persistence of arboviruses and antiviral antibodies in vertebrate hosts: its occurrence and impacts. *Rev Med Virol* 2001a; 11: 165-90.
- Kuno G. Transmission of arboviruses without involvement of arthropod vectors. *Acta Virol* 2001b; 45: 139-50.
- Lanciotti R.S., Roehrig J.T., Deubel V., Smith J., Parker M., Steele K., Crise B., Volpe K.E., Crabtree M.B., Scherret J.H., Hall R.A., MacKenzie J.S., Cropp C.B., Panigrahy B., Ostlund E., Schmitt B., Malkinson M., Banet C., Weissman J., Komar N., Savage H.M., Stone W., McNamara T., Gubler D.J. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science* 1999; 286: 2333-7.
- Lanciotti R.S., Kerst A.J., Nasci R.S., Godsey M.S., Mitchell C.J., Savage H.M., Komar N., Panella N.A., Allen B.C., Volpe K.E., Davis B.S., Roehrig J.T. 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* 2000; 38: 4066-71.
- Langevin S.A., Bunning M., Davis B., Komar N. Experimental infection of chickens as candidate sentinels for West Nile virus. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 726-9.
- Langevin S.A., Brault A.C., Panella N.A., Bowen R.A., Komar N. Variation in virulence of west nile virus strains for house sparrows (*Passer domesticus*). *Am J Trop Med Hyg* 2005; 72: 99-102.
- Lawrie C.H., N.Y. U., E.A. G., Nuttal P.A. Ixodid and Argasid tick species and West Nile virus. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 653-57.

- Le Lay-Rogues G., Arthur C.P., Vanderwalle P., Hardy E., Chastel C. Lapin de Garenne, *Oryctogalus cuniculus* L. et arbovirus dans le sud-est de la France. Résultats de deux enquêtes sérologiques. *Bull Soc Pathol Exot* 1990; 83: 446-57.
- Leblond A. *Diagnostic des épidémies émergentes chez le cheval : cas de la Fièvre du Nil Occidental en Camargue*. Diplôme d'habilitation à diriger des recherches. Médecine interne des équidés. Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Marcy l'Etoile; 2006: 63.
- Lefrancois T., Blitvich B.J., Pradel J., Molia S., Vachiery N., Pallavicini G., Marlenee N.L., Zientara S., Petitclerc M., Martinez D. West Nile virus surveillance, Guadeloupe, 2003-2004. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1100-3.
- Lindsay R., Barker I., Nayar G., Drebot M., Calvin S., Scammell C., Sachvie C., Fleur T.S., Dibernardo A., Andonova M., Artsob H. Rapid antigen-capture assay to detect West Nile virus in dead corvids. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 1406-10.
- Lord C.C., Rutledge R.C., Tabachnick W.J. Relationships between host viremia and vector susceptibility for arboviruses. *J Med Entomol* 2006; 43: 623-30.
- Lord R.D., Calisher C.H. Further evidence of southward transport of arboviruses by migratory birds. *Am J Epidemiol* 1970; 92: 73-8.
- Lord R.D., Calisher C.H., Chappell W.A., Metzger W.R., Fischer G.W. Urban St. Louis encephalitis surveillance through wild birds. *Am J Epidemiol* 1974; 99: 360-3.
- Ludwig G.V., Cook R.A., McLean R.G., Francy D.B. Viremic enhancement due to transovarially acquired antibodies to St. Louis encephalitis virus in birds. *J Wildl Dis* 1986; 22: 326-34.
- Ludwig G.V., Calle P.P., Mangiafico J.A., Raphael B.L., Danner D.K., Hile J.A., Clippinger T.L., Smith J.F., Cook R.A., McNamara T. An outbreak of West Nile virus in a New York City captive wildlife population. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 67: 67-75.
- Lvov D.K., Butenko A.M., Gromashevskii V.L., Kovtunov A.I., Prilipov A.G., Kinney R.M., Aristova V.A., Dzharkenov A.F., Samokhvalov E.I., Savage H.M., Shchelkanov M.Y., Galkina I.V., Deryabin P.G., Gubler D.J., Kulikova L.N., Alkhovsky S.K., Moskvina T.M., Zlobina L.V., Sadykova G.K., Shatalov A.G., Lvov D.N., Usachev V.E., Voronina A.G. West Nile and other zoonotic viruses in Russia: examples of emerging-reemerging situations. *Arch Virol (suppl)* 2004; 18: 85-96.
- Mackenzie J.S., Barrett A.D., Deubel V. The Japanese encephalitis serological group of flaviviruses: a brief introduction to the group. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 267: 1-10.
- Madge S., Burn H. *Guide des corbeaux, geais et pies du monde entier*. Paris: Editions Vigot; 1996.
- Mahy B.W.J., Brown C.C. Emerging zoonoses: crossing the species barrier. *Rev Sci Tech OIE* 2000; 19: 33-40.
- Main A.J., Anderson K.S., Maxfield H.K., Rosenau B., Oliver C. Duration of Alphavirus neutralizing antibody in naturally infected birds. *Am J Trop Med Hyg* 1988; 38: 208-17.
- Malakoff D. Infectious disease. Bird advocates fear that West Nile virus could silence the spring. *Science* 2002; 297: 1989.
- Malkinson M., Weisman Y., Pokamonski S., King R., Deubel V. Intercontinental transmission of West Nile virus by migrating white storks. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 540.
- Malkinson M., Banet C. The role of birds in the ecology of West Nile virus in Europe and Africa. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 267: 309-22.
- Malkinson M., Banet C., Weisman Y., Pokamunski S., King R., Drouet M.T., Deubel V. Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 392-7.
- Manilla G. *Fauna d'Italia: Acari Ixodida*. Bologna: Edizioni Calderini Bologna; 1998.

- Marchant J. Learning about bird movements: methods of study. In: Wernham C., Toms M., Marchant J., Clark J. et al. eds. *The migration atlas. Movements of the birds of Britain and Ireland*. London: T & AD Poyser Ltd; 2002: 1-13.
- Marra P.P., Griffing S.M., McLean R.G. West Nile virus and wildlife health. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 898-9.
- Marra P.P., Griffing S., Caffrey C., Kilpatrick A.M., McLean R., Brand C., Saito E., Dupuis A.P., Kramer L., Novak R. West Nile virus and wildlife. *BioScience* 2004; 54: 393-402.
- Martinez J., Tomas G., Merino S., Arriero E., Moreno J. Detection of serum immunoglobulins in wild birds by direct ELISA: a methodological study to validate the technique in different species using anti-chicken antibodies. *Functional ecology* 2003; 17: 700-6.
- McIntosh B.M., Madsen W., Dickinson D.B. Ecological studies on Sindbis and West Nile viruses in South Africa. VI. The antibody response of wild birds. *S Afr J Med Sci* 1969; 34: 83-91.
- McLean R.G., Mullenix J., Kerschner J., Hamm J. The house sparrow (*Passer domesticus*) as a sentinel for St. Louis encephalitis virus. *Am J Trop Med Hyg* 1983; 32: 1120-9.
- McLean R.G. Arboviruses of wild birds and mammals. *Bull Soc Vector Ecol* 1991; 16: 3-16.
- McLean R.G., Ubico S.R., Docherty D.E., Hansen W.R., Sileo L., McNamara T.S. West Nile virus transmission and ecology in birds. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 951: 54-7.
- McLean R.G., Ubico S.R., Bourne D., Komar N. West Nile virus in livestock and wildlife. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 267: 271-308.
- McMichael A.J. Environmental and social influences on emerging infectious diseases: past, present and future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2004; 359: 1049-58.
- Mellor P.S. Environmental influences on arbovirus infections and vectors. In: Gillespie S.H., Smith G.L. and Osbourn A. eds. *Microbe-vector interactions in vector-borne diseases*. Cambridge: Cambridge University Press; 2004: 183-99.
- Molaei G., Andreadis T.G., Armstrong P.M., Anderson J.F., Vossbrinck C.R. Host feeding patterns of *Culex* mosquitoes and West Nile virus transmission, Northeastern United States. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 468-74.
- Monath T.P., Heinz F.X. Flaviviruses. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. and al. eds. *Fields virology*. 3<sup>rd</sup> edition. Philadelphia: Raven Publishers; 1996: 961-1034.
- Morales M.A., Barrandeguy M., Fabbri C., Garcia J.B., Vissani A., Trono K., Gutierrez G., Pigretti S., Menchaca H., Garrido N., Taylor N., Fernandez F., Levis S., Enria D. West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 1559-61.
- Morse S.S. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 1995; 1: 7-15.
- Mostashari F., Kulldorff M., Hartman J.J., Miller J.R., Kulasekera V. Dead bird clusters as an early warning system for West Nile virus activity. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 641-6.
- Mouchet J., Rageau J., Chippaux A. Hibernation de *Culex modestus* (Diptera, Culicidae) en Camargue. *Cah O.R.S.T.O.M. Ent Med et parasitol* 1969; 7: 35-7.
- Mouchet J., Rageau J., Laumond C., Hannoun C., Beytout D., Oudar J., Corniou B., Chippaux A. Epidémiologie du virus West Nile : étude d'un foyer en Camargue. V. Le vecteur : *Culex modestus* Ficalbi Diptera; Culicidae. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 1970; 118: 839-55.
- Moutou F. Place des oiseaux sauvages en épidémiologie animale. In: Clergeau P. ed. *Oiseaux à risques en ville et en campagne*. Paris: INRA éditions; 1997: 263-78.
- Moutou F. Epidémiologie et faune sauvage en Europe. *Epidémiol et santé anim* 2000; 37: 1-8.
- Moutou F. Les migrations aviaires et le transport des agents infectieux. In: Cohen G. Mathiot C. and Le Minor L. eds. *La veille microbiologique*. Paris: Elsevier; 2001: 77-90.

- Mumcuoglu K.Y., Banet-Noach C., Malkinson M., Shalom U., Galun R. Argasid ticks as possible vectors of West Nile virus in Israel. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2005; 5: 65-71.
- Murgue B., Murri S., Triki H., Deubel V., Zeller H.G. West Nile in the Mediterranean basin: 1950-2000. *Ann N Y Acad Sci* 2001a; 951: 117-26.
- Murgue B., Murri S., Zientara S., Durand B., Durand J.P., Zeller H. West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years. *Emerg Infect Dis* 2001b; 7: 692-6.
- Murgue B., Zeller H., Deubel V. The ecology and epidemiology of West Nile virus in Africa, Europe and Asia. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 267: 195-221.
- Nagendran M., Higuchi H., Sorokin A.G. A harnessing technique to deploy transmitters on cranes. In: Higuchi H. and Minton J. eds. *The future of cranes and wetlands*; 1994: 57-60. Accessible en ligne : [http://www.wing-wbsj.or.jp/proceedings/crane\\_08.pdf](http://www.wing-wbsj.or.jp/proceedings/crane_08.pdf).
- Nasci R.S., Savage H.M., White D.J., Miller J.R., Cropp B.C., Godsey M.S., Kerst A.J., Bennett P., Gottfried K., Lanciotti R.S. West Nile virus in overwintering *Culex* mosquitoes, New York City, 2000. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 742-4.
- Nasci R.S., Komar N., Marfin A.A., Ludwig G.V., Kramer L.D., Daniels T.J., Falco R.C., Campbell S.R., Brookes K., Gottfried K.L., Burkhalter K.L., Aspen S.E., Kerst A.J., Lanciotti R.S., Moore C.G. Detection of West Nile virus-infected mosquitoes and seropositive juvenile birds in the vicinity of virus-positive dead birds. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 67: 492-6.
- Naugle D.E., Aldridge C.L., Walker B.L., Cornish T.E., Moynahan B.J., Holloran M.J., Brown K., Johnson G.D., Schmidtman E.T., Mayer R.T., Kato C.Y., Matchett M.R., Christiansen T.J., Cook W.E., Creekmore T., Falise R.D., Rinkes E.T., Boyce M.S. West Nile virus: pending crisis for greater sage-grouse. *Ecology letters* 2004; 7: 704-13.
- Nelson R.L., Tempelis C.H., Reeves W.C., Milby M.M. Relation of mosquito density to bird: mammal feeding ratios of *Culex tarsalis* in stable traps. *Am J Trop Med Hyg* 1976; 25: 644-54.
- Nielsen K., Smith P., Yu W., Nicoletti P., Elzer P., Robles C., Bermudez R., Renteria T., Moreno F., Riuz A., Massengill C., Muenks Q., Jurgensen G., Tollersrud T., Samartino L., Conde S., Forbes L., Gall D., Perez B., Rojas X., Minas A. Towards screening tests for brucellosis. *Rev Sci Tech OIE* 2005; 24: 1027-38.
- Nir Y., Lasowski Y., Avivi A., Goldwasser R. Survey for antibodies to arboviruses in the serum of various animals in Israel during 1965-1966. *Am J Trop Med Hyg* 1969; 18: 416-22.
- Nir Y., Avivi A., Lasovski Y., Margalit J., Goldwasser R. Arbovirus activity in Israel. *Isr J Med Sci* 1972; 8: 1695-701.
- Nuttall P.A. Viruses, bacteria, and fungi of birds. In: Clayton D.H. and Moore J. eds. *Host-parasite evolution: general principles and avian models*. Oxford: Oxford University Press; 1997: 271-302.
- Olsen B., Munster V.J., Wallensten A., Waldenström J., Osterhaus A.D.M.E., Fouchier R.A.M. Global patterns of Influenza A virus in wild birds. *Science* 2006; 312: 384-8.
- Ostfeld R.S., Keesing F. The function of biodiversity in the ecology of vector-borne zoonotic diseases. *Can J Zool* 2000; 78: 2061-78.
- Oudar J., Joubert L., Lapras M., Guillon J.C. Reproduction expérimentale de la méningo-encéphalite du cheval par l'arbovirus West Nile. II. Etude anatomo-clinique. *Bull Acad Vét* 1971a; 44: 147-58.
- Oudar J., Joubert L., Lapras M., Hannoun C., Guillon J.C. Reproduction expérimentale de la méningo-encéphalite animale par l'arbovirus West Nile. IV. Recherche de réservoirs de virus. Inoculation au Mouton et au Porc. *Bull Acad Vét* 1971b; 44: 195-206.
- Panthier R., Hannoun C., Oudar J., Beytout D., Corniou B., Joubert L., Guillon J.C., Mouchet J. Isolement du virus West Nile chez un cheval de Camargue atteint d'encéphalomyélite. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 1966; 262: 1308-10.

- Peterson A.T., Komar N., Komar O., Navarro-Sigüenza A., Robbins M.B., Martinez-Meyer E. West Nile virus in the New World: potential impacts on bird species. *Bird Conservation International* 2004; 14: 215-32.
- Philibert H., Wobeser G., Clark R.G. Counting dead birds: examination of methods. *J Wildl Dis* 1993; 29: 284-9.
- Poulin R. *Evolutionary ecology of parasites*. London: Chapman & Hall; 1998.
- Quirin R., Salas M., Zientara S., Zeller H., Labie J., Murri S., Lefrançois T., Petitclerc M., Martinez D. West Nile Virus, Guadeloupe. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 706-8.
- Raoult D., Roussellier P., Rodhain F., Hannoun C. Enquête séroépidémiologique en Camargue sur les virus transmis par les arthropodes (1983). *Médecine et maladies infectieuses* 1985; 11: 636-8.
- Rappole J.H., Hubalek Z. Migratory birds and West Nile virus. *J Appl Microbiol* 2003; 94 Suppl: 47S-58S.
- Reeves W.C., Sturgeon J.M., French E.M., Brookman B. Transovarian transmission of neutralizing substances to western equine and St. Louis encephalitis viruses by avian hosts. *J Infect Dis* 1954; 95: 168-78.
- Reeves W.C. Overwintering of arboviruses. *Prog Med Virol* 1974; 17: 193-220.
- Reisen W., Lothrop H., Chiles R., Madon M., Cossen C., Woods L., Husted S., Kramer V., Edman J. West Nile virus in California. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 1369-78.
- Reisen W.K. North American mosquito-borne arboviruses: questions of persistence and amplification. *Bull Soc Vector Ecol* 1990; 15: 11-21.
- Reisen W.K., Hardy J.L., Presser S.B. Evaluation of domestic pigeons as sentinels for detecting arbovirus activity in southern California. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 46: 69-79.
- Reisen W.K., Kramer L.D., Chiles R.E., Green E.N., Martinez V.M. Encephalitis virus persistence in California birds: preliminary studies with House Finches. *J Med Entomol* 2001; 38: 393-9.
- Reisen W.K., Chiles R.E., Green E.N., Fang Y., Mahmood F., Martinez V.M., Laver T. Effects of immunosuppression on encephalitis virus infection in the house finch, *Carpodacus mexicanus*. *J Med Entomol* 2003a; 40: 206-14.
- Reisen W.K., Chiles R.E., Martinez V.M., Fang Y., Green E.N. Experimental infection of California birds with western equine encephalomyelitis and St. Louis encephalitis viruses. *J Med Entomol* 2003b; 40: 968-82.
- Reisen W.K., Fang Y., Martinez V.M. Avian host and mosquito (Diptera: Culicidae) vector competence determine the efficiency of West Nile and St. Louis encephalitis virus transmission. *J Med Entomol* 2005a; 42: 367-75.
- Reisen W.K., Wheeler S.S., Yamamoto S., Fang Y., Garcia S. Nesting Ardeid colonies are not a focus of elevated West Nile virus activity in southern California. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2005b; 5: 258-66.
- Reisen W.K., Barker C.M., Carney R., Lothrop H.D., Wheeler S.S., Wilson J.L., Madon M.B., Takahashi R., Carroll B., Garcia S., Fang Y., Shafii M., Kahl N., Ashtari S., Kramer V., Glaser C., Jean C. Role of corvids in the epidemiology of West Nile virus in southern California. *J Med Entomol* 2006a; 43: 356-67.
- Reisen W.K., Fang Y., Lothrop H.D., Martinez V.M., Wilson J., O'Connor P., Carney R., Cahoon-Young B., Shafii M., Brault A.C. Overwintering of West Nile virus in Southern California. *J Med Entomol* 2006b; 43: 344-55.
- Reisen W.K., Fang Y., Martinez V.M. Effects of temperature on the transmission of West Nile virus by *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 2006c; 43: 309-17.
- Richards O.W., Davies R.G. *A general textbook of entomology*. London: Methuen & Co LDT; 1960.



- Ringia A.M., Blitvich B.J., Koo H.Y., Van de Wyngaerde M., Brawn J.D., Novak R.J. Antibody prevalence of West Nile virus in birds, Illinois, 2002. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 1120-4.
- Ritchie B.W. *Avian viruses: function and control*. Lake Worth, Florida, USA: Wingers Publishing, Inc.; 1995.
- Rodhain F., Perez C. *Précis d'entomologie médicale et vétérinaire*. Paris: Maloine SA éditeur; 1985.
- Rodhain F. La transmission vectorielle. *Bull Soc Pathol Exot* 1989; 82: 167-72.
- Rodhain F. La notion de réservoir naturel en avirologie. *Bull Soc Pathol Exot* 1998; 91: 279-82.
- Rodhain F. Emergence de maladies à transmission vectorielle. *Epidémiol et santé anim* 2003; 43.
- Rodrigues F.M., Guttikar S.N., Pinto B.D. Prevalence of antibodies to Japanese encephalitis and West Nile viruses among wild birds in the Krishna-Godavari Delta, Andhra Pradesh, India. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1981; 75: 258-62.
- Roitt I., Brostoff J., Male D. *Immunologie*. Paris: De Boek Université; 1997.
- Rollin P.E., Rollin D., Martin P., Baylet R., Rodhain F., Hannoun C. Résultats d'enquêtes séroépidémiologiques récentes sur les arboviroses en Camargue : populations humaines, équines, bovines et aviaires. *Médecine et maladies infectieuses* 1982; 12: 77-80.
- Russell C.B., Hunter F.F. 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* 2005; 42: 301-5.
- Sabio I.J., Mackay A.J., Roy A., Foil L.D. Detection of West Nile virus RNA in pools of three species of ceratopogonids (Diptera: Ceratopogonidae) collected in Louisiana. *J Med Entomol* 2006; 43: 1020-2.
- Samoilova T.I., Votjakov V.I., Titov L.P. Virologic and serologic investigations of West Nile virus circulation in Belarus. *Cent Eur J Public Health* 2003; 11: 55-62.
- Savage H.M., Ceianu C., Nicolescu G., Karabatsos N., Lanciotti R., Vladimirescu A., Laiv L., Ungureanu A., Romanca C., Tsai T.F. Entomologic and avian investigations of an epidemic of West Nile fever in Romania in 1996, with serologic and molecular characterization of a virus isolate from mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61: 600-11.
- Schaub M., Jenni L. Stopover duration of three warbler species along their autumn migratory route. *Oecologia* 2001; 128: 217-27.
- Schmidt J.R., Elmansoury H.K. Natural and Experimental Infection of Egyptian Equines with West Nile Virus. *Ann Trop Med Parasitol* 1963; 57: 415-27.
- Schmidt K.A., Ostfeld R.S. Biodiversity and the dilution effect in disease ecology. *Ecology* 2000; 82: 609-19.
- Scott T.W., Lorenz L.H., Edman J.D. Effects of house sparrow age and arbovirus infection on attraction of mosquitoes. *J Med Entomol* 1990; 27: 856-63.
- Scott T.W., Edman J.D. Effects of avian host age and arbovirus infection on mosquito attraction and blood-feeding success. In: Loye J.E. and Zuk M. eds. *Bird-parasite interactions. Ecology, evolution, and behaviour*. Oxford: Oxford University Press; 1991: 179-204.
- Seel D.C. Moults in five species of corvidae in Britain. *Ibis* 1976; 118: 491-527.
- Senne D.A., Pedersen J.C., Hutto D.L., Taylor W.D., Schmitt B.J., Panigrahy B. Pathogenicity of West Nile virus in chickens. *Avian Dis* 2000; 44: 642-9.
- Simpson D.I.H. Toga- and Flaviviruses. In: Mc Ferran J.B. and Mc Nulty M.S. eds. *Virus infections of vertebrates. Virus infections of birds*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.; 1993: 231-41.

- Sooter C.A., Schaeffer M., Gorrie R., Cockburn T.A. Transovarian passage of antibodies following naturally acquired encephalitis infection in birds. *J Infect Dis* 1954; 95: 165-7.
- Stamm D.D. Relationships of birds and arboviruses. *The Auk* 1966; 83: 84-97.
- Stone W.B., Okoniewski J.C., Therrien J.E., Kramer L.D., Kauffman E.B., Eidson M. VecTest as diagnostic and surveillance tool for West Nile virus in dead birds. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 2175-81.
- Stout W.E., Cassini A.G., Meece J.K., Papp J.M., Rosenfield R.N., Reed K.D. Serologic evidence of West Nile virus infection in three wild raptor populations. *Avian Dis* 2005; 49: 371-5.
- Sutherland W.J. *Ecological census techniques. A handbook*. Cambridge: Cambridge University Press; 1996.
- Svensson L. *Identification guide to European passerines*. Stockholm: British Trust for Ornithology BTO Tring; 1984.
- Swayne D.E., Beck J.R., Zaki S. Pathogenicity of West Nile virus for turkeys. *Avian Dis* 2000; 44: 932-7.
- Swayne D.E., Beck J.R., Smith C.S., Shieh W.J., Zaki S.R. Fatal encephalitis and myocarditis in young domestic geese (*Anser anser domesticus*) caused by West Nile virus. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 751-3.
- Taylor L.H., Latham S.M., Woolhouse M.E. Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001; 356: 983-9.
- Taylor R.M., Work T.H., Hurlbut H.S., Rizk F. A study of the ecology of West Nile virus in Egypt. *Am J Trop Med Hyg* 1956; 5: 579-620.
- Teehee M.L., Bunning M.L., Stevens S., Bowen R.A. Experimental infection of pigs with West Nile virus. *Arch Virol* 2005; 150: 1249-56.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weigh matrix choice. *Nucleic Acid Res* 1994; 22: 4673-80.
- Thrusfield M. *Veterinary epidemiology*. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd; 2005.
- Tiawsirisup S., Platt K.B., Evans R.B., Rowley W.A. A comparison of West Nile Virus transmission by *Ochlerotatus trivittatus* (COQ.), *Culex pipiens* (L.), and *Aedes albopictus* (Skuse). *Vector Borne Zoonotic Dis* 2005; 5: 40-7.
- Toma B., Dufour B., Sanaa M., Bénét J.J., Shaw A., Moutou F., Louza A. *Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures*. Maisons-Alfort: AEEMA; 2001.
- Tonry J.H., Xiao S.Y., Siirin M., Chen H., da Rosa A.P., Tesh R.B. Persistent shedding of West Nile virus in urine of experimentally infected hamsters. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 72: 320-4.
- Toussaint Y. *Espèces d'oiseaux potentiellement impliquées dans l'écologie du virus de West Nile en Camargue*. Thèse vétérinaire. Université Claude Bernard, Lyon I; 2003: 198.
- Turell M.J., O'Guinn M., Oliver J. Potential for New York mosquitoes to transmit West Nile virus. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 62: 413-4.
- Valiente Moro C., Chauve C., Zenner L. Vectorial role of some dermanyssoid mites (Acari, Mesostigmata, Dermanyssoidea). *Parasite* 2005; 12: 99-109.
- van der Meulen K.M., Pensaert M.B., Nauwynck H.J. West Nile virus in the vertebrate world. *Arch Virol* 2005; 150: 637-57.
- Voisin C. *The herons of Europe*. London: T. and A.D. Poyser Ltd; 1991.

- Voisin C. The migration of Purple Herons (*Ardea purpurea*) ringed in France. *Die Vogelwarte* 1996; 38: 155-68.
- Wakelin D., Apanius V. Immune defense: genetic control. In: Clayton, DH and Moore, J, ed. *Host-parasite evolution. General principles and avian models*. Oxford: Oxford University Press; 1997: 30-58.
- Walendström J., Broman T., Carlsson I., Hasselquist D., Achterberg R.P., Wagenaar J.A., Olsen B. Prevalence of *Campylobacter lari* and *Campylobacter coli* in different ecological guilds and taxa of migrating birds. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 5911-7.
- Ward M.P., Raim A., Yaremych-Hamer S., Lampman R., Novak R.J. Does the roosting behavior of birds affect transmission dynamics of West Nile virus. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 75: 350-5.
- Weaver S.C., Coffey L.L., Nussenzweig R., Ortiz D., Smith D. Vector competence. In: Gillespie S.H., Smith G.L. and Osbourn A. eds. *Microbe-vector interactions in vector-borne diseases*. Cambridge: Cambridge University Press; 2004: 139-80.
- Weingartl H.M., Neufeld J.L., Copps J., Marszal P. Experimental West Nile virus infection in blue jays (*Cyanocitta cristata*) and crows (*Corvus brachyrhynchos*). *Vet Pathol* 2004; 41: 362-70.
- Wernham C., Siriwardena G. Analysis and interpretation of the ring-recovery data. In: Wernham C., Toms M., Marchant J., Clark J. et al. eds. *The migration atlas. Movements of the birds of Britain and Ireland*. London: T & AD Poyser Ltd; 2002: 44-69.
- Wink M. Use of DNA markers to study bird migration. *J Ornithol* 2006; 147: 234-44.
- Wobeser G., Wobeser A.G. Carcass disappearance and estimation of mortality in a simulated die-off of small birds. *J Wildl Dis* 1992; 28: 548-54.
- Wobeser G.A. *Investigation and management of diseases in wild animals*. New York: Plenum Press; 1994.
- Wonham M.J., Lewis M.A., Renclawowicz J., van den Driessche P. Transmission assumptions generate conflicting predictions in host-vector disease models: a case study in West Nile virus. *Ecology letters* 2006; 9: 706-25.
- Work T.H., Hurlbut H.S., Taylor R.M. Indigenous wild birds of the Nile Delta as potential West Nile virus circulating reservoirs. *Am J Trop Med Hyg* 1955; 4: 872-88.
- Wunschmann A., Shivers J., Bender J., Carroll L., Fuller S., Saggese M., van Wettene A., Redig P. Pathologic and immunohistochemical findings in goshawks (*Accipiter gentilis*) and great horned owls (*Bubo virginianus*) naturally infected with West Nile virus. *Avian Dis* 2005; 49: 252-9.
- Xiao S.Y., Guzman H., Zhang H., Travassos da Rosa A.P., Tesh R.B. West Nile virus infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*): a model for West Nile encephalitis. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 714-21.
- Yaremych S.A., Warner R.E., Van de Wyngaerde M.T., Ringia A.M., Lampman R., Novak R.J. West Nile virus detection in American crows. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 1319-21.
- Yaremych S.A., Novak R., Raim A., Mankin P.C., Warner R.E. Home range and habitat use by American crows in relation to transmission of West Nile virus. *Wilson Bulletin* 2004a; 116: 232-9.
- Yaremych S.A., Warner R.E., Mankin P.C., Brawn J.D., Raim A., Novak R.J. West Nile virus and high death rate in American Crows. *Emerg Infect Dis* 2004b; 10: 709-14.
- Yoccoz N.G., Nichols J.D., Boulinier T. Monitoring of biological diversity in space and time. *Trends in Ecology and Evolution* 2001; 16: 446-53.
- Zeller H., Zientara S., Hars J., Languille J., Mailles A., Tolou H., Paty M.C., Schaffner F., Armengaud A., Gaillan P., Legras J.F., Hendrikx P. West Nile outbreak in horses in Southern France: September 2004. 2004, 8. Accessible en ligne : <http://www.eurosurveillance.org/ew/2004/041007.asp>

Zeller H.G., Murgue B. Rôle des oiseaux migrateurs dans l'épidémiologie du virus de West Nile. *Med Mal Infect* 2001; 31: 168-74.

Zeller H.G., Schuffenecker I. West Nile virus: an overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23: 147-56.



---

***NOM SCIENTIFIQUE  
DES OISEAUX CITES  
DANS LE TEXTE***

---



Accenteur mouchet <i>Prunella modularis</i>	Merle américain <i>Turdus migratorius</i>
Bécassine des marais <i>Gallinago gallinago</i>	Mésange charbonnière <i>Parus major</i>
Bergeronnette grise <i>Motacilla alba</i>	Moineau domestique <i>Passer domesticus</i>
Bouscarle de Cetti <i>Cettia cetti</i>	Moineau friquet <i>Passer montanus</i>
Bruant à couronne blanche <i>Zonotrichia leucophrys</i>	Mouette rieuse <i>Larus ridibundus</i>
Canard colvert <i>Anas platyrhynchos</i>	Phragmite des joncs <i>Acrocephalus schoenobaenus</i>
Canard de barbarie <i>Cairina moschata</i>	Pie à bec noir d'Amérique <i>Pica hudsonia</i>
Choucas des tours <i>Corvus monedula</i>	Pie bavarde <i>Pica pica</i>
Corneille américaine <i>Corvus brachyrhynchos</i>	Pie-grièche à tête rousse <i>Lanius senator</i>
Corneille noire <i>Corvus corone</i>	Pigeon biset <i>Columba livia</i>
Coucou gris <i>Cuculus canorus</i>	Pouillot fitis <i>Phylloscopus trochilus</i>
Fauvette à tête noire <i>Sylvia atricapilla</i>	Pouillot siffleur <i>Phylloscopus sibilatrix</i>
Fauvette des jardins <i>Sylvia borin</i>	Pouillot véloce <i>Phylloscopus collybita</i>
Fauvette grisette <i>Sylvia communis</i>	Poule domestique <i>Gallus gallus</i>
Fauvette passerinette <i>Sylvia cantillans</i>	Roselin familier <i>Carpodacus mexicanus</i>
Flamant rose <i>Phoenicopterus roseus</i>	Rouge-gorge familier <i>Erithacus rubecula</i>
Foulque macroule <i>Fulica atra</i>	Rouge-queue à front blanc <i>Phoenicurus phoenicurus</i>
Fuligule morillon <i>Aythya fuligula</i>	Rouge-queue noir <i>Phoenicurus ochruros</i>
Gobe-mouche gris <i>Muscicapa striata</i>	Rossignol philomèle <i>Luscinia megarhynchos</i>
Gobe-mouche noir <i>Ficedula hypoleuca</i>	Rousserole effarvatte <i>Acrocephalus scirpaceus</i>
Goéland leucophée <i>Larus cachinnans</i>	Rousserolle turdoïde <i>Acrocephalus arundinaceus</i>
Grue cendrée <i>Grus grus</i>	Sarcelle d'été <i>Anas querquedula</i>
Héron garde-bœufs <i>Bubulcus ibis</i>	Tourterelle des bois <i>Streptopelia turtur</i>
Héron pourpré <i>Ardea purpurea</i>	Tourterelle domestique <i>Streptopelia risoria</i>
Hirondelle rustique <i>Hirundo rustica</i>	Tourterelle maillée <i>Streptopelia senegalensis</i>
Huppe fasciée <i>Upupa epops</i>	Tourterelle turque <i>Streptopelia decaocto</i>
Hypolaïs polyglotte <i>Hippolais polyglotta</i>	Traquet motteux <i>Oenanthe oenanthe</i>





---

# ***ARTICLES***

---



**Périodes à risque pour l'introduction de  
pathogènes en Camargue**

---

***Article 1***

---

Article soumis  
*Revue : Emerging Infectious Diseases*

***Bird migration routes and pathogen dispersion risk  
into western Mediterranean wetlands***



## **Bird migration routes and pathogen dispersion risk into western Mediterranean wetlands**

### **Jourdain E. (DVM)**

Station Biologique de la Tour du Valat, Le Sambuc, F-13200 Arles, France  
Unité EPSP-TIMC, UMR 55-25, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon – Institut National de Recherche Agronomique, 1 avenue Bourgelat, F-69280 Marcy l'Etoile, France

### **Gauthier-Clerc M. (DVM, PhD)**

Station Biologique de la Tour du Valat, Le Sambuc, F-13200 Arles, France

### **Bicout D. J. (PhD)**

Unité EPSP-TIMC, UMR 55-25, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, 1 avenue Bourgelat, F-69280 Marcy l'Etoile, France

### **Sabatier P. (PhD)**

Unité EPSP-TIMC, UMR 55-25, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon – Institut National de Recherche Agronomique, 1 avenue Bourgelat, F-69280 Marcy l'Etoile, France

**Word count:** abstract – 115; text of the article – 3765.

### **Corresponding author**

Elsa Jourdain

Unité EPSP-TIMC, UMR 55-25

Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon – Institut National de Recherche Agronomique

1, avenue Bourgelat

F-69280 Marcy l'Etoile, France

Email: [e.jourdain@vet-lyon.fr](mailto:e.jourdain@vet-lyon.fr)

Tel: +(33) 490.97.29.54; Fax: +(33) 490.97.20.19

**Keywords:** BIRDS, MIGRATION, DISEASE TRANSMISSION, AVIAN INFLUENZA, WEST NILE VIRUS

**ABSTRACT**

Wild birds share with humans the capacity of moving fast over large distances. During these migratory movements, birds carry pathogens that can be transmitted between species at breeding, wintering and stopover places where numerous individuals of various species are concentrated. In this article, we consider the area of the Camargue (southern France) as an example to highlight how *ad hoc* information already available on birds' movements, abundance and diversity can help assess the introduction and transmission risk of bird-borne diseases in western Mediterranean wetlands. The discussion is based on the examples of avian influenza and West Nile viruses, as birds are central to their epidemiology. Methodological biases and projects for future research are briefly discussed.

**ARTICLE SUMMARY LINE**

Migratory movements of wild birds, together with alternating periods of concentration, can promote the dispersion and emergence of potentially zoonotic infectious agents such as avian influenza and West Nile viruses in western Mediterranean wetlands.

**RUNNING TITLE**

Wild birds movements and pathogen dispersion

## INTRODUCTION

Birds are the only terrestrial vertebrates that share with humans the peculiarity of traveling in a few hours across national and intercontinental borders. The record for distance covered in a single year belongs to the Arctic tern (*Sterna paradisaea*) with journeys of about 50,000 km between Antarctica and Northern Scandinavia. As a whole, billions of birds travel between continents twice a year in only a few weeks (1). During these yearly migrations, birds have the potential of dispersing pathogenic microorganisms which can be dangerous for public health as well as animal health (2, 3). They are believed, for instance, to be responsible for the wide geographic distribution of various pathogens including viruses (West Nile, Sindbis, Influenza A, Newcastle), bacteria (*Borrelia*, *Mycobacterium*, *Salmonella*) or protozoa (*Cryptosporidium*). Among them are emerging viruses with different epidemiological patterns, such as avian influenza (AI) and West Nile (WN) viruses which respectively have a water-borne (4-8) and a vector-borne (9-12) transmission cycle.

Insight into the ecology of bird populations is necessary to understand the epidemiology of bird-associated diseases. Furthermore, data about avian movements might help to improve disease surveillance schemes or to adapt preventive measures. However, solid bridges between ecology and human medicine are still lacking. In an exploratory way, we focus in the present paper on the bird section, in the aim to provide health care workers with some general ideas on bird abundance, migration, geographic origin and inter-specific mingling. For this empirical purpose, we focus on the Camargue area, an alluvial lowland covering some 140,000 ha in the Rhône delta. As other Mediterranean wetlands (Figure 1), the Camargue is indeed a major rallying point for Palearctic birds migrating between the great continental masses of Eurasia and Africa.

The questions we address are the following: (a) What are the main geographic origins of birds observed in western Mediterranean wetlands? (b) How abundant and diverse in species are they during the year cycle? (c) And when inter-specific contacts between birds from different origins are the most likely to occur? How these questions may help to assess the dispersion risk of bird-carried pathogens into Mediterranean wetlands is discussed using the examples of AI and WN viruses.

In order to address this issue as simply as possible, we chose to make use of crude empirical indices, which are known to suffer biases yet prove valuable enough within the scope of our objectives. Some of these biases and projects for future research are briefly discussed at the end of the article. Readers interested in modern ecological methods used to study wildlife diseases in natural populations may refer to general publications on host-parasite systems (13-15).



## METHODS

### Bird origins from individual ringing

Migration research is constantly changing and new methods are always emerging. Historically, it is through banding studies that information about the movements of individual birds was first acquired. This method consists in catching a bird, which is identified and measured, banding it, and then releasing it. The corresponding information is transferred into a database thanks to which any bird captured with a band can be identified. In Europe, large scale banding projects have been done, mostly between the 1950s and 1980s, and represent a gold mine of information that has not yet been fully exploited.

Banding recoveries of birds tagged with rings delivered by the *Museum National d'Histoire Naturelle* (Paris) between 1950 and 1975, at the *Station Biologique de la Tour du Valat* in the Camargue, were collected from annuals reports. Seven species of waterbirds were chosen in order to illustrate various migratory patterns. We selected four species of the Anatidae family known to have different geographic origins, including three dabbling ducks, *i.e.* ducks which search for their food primarily in surface water (Mallard, *Anas platyrhynchos*, number of recoveries  $n=434$ ; Green-winged teal, *Anas crecca*,  $n=3903$ ; Garganey, *Anas querquedula*,  $n=181$ ) and one diving duck, *i.e.* a species that mostly searches for its food under the water (Tufted duck, *Aythya fuligula*,  $n=313$ ). We also took the example of the Common coot (*Fulica atra*,  $n=99$ ), a diving bird of the Rallidae family which frequently shares water-ponds with ducks. The Common snipe (*Gallinago gallinago*,  $n=54$ ) is an example among waders, *i.e.* shorebirds which feed in muddy swamps and coastlines. Finally, the Purple heron (*Ardea purpurea*,  $n=39$ ) is an ardeid species living in reed beds and marshes. All these species are large or hunted, explaining the high number of rings recovered. Only rings recovered outside of France were considered.

### Migratory bird abundance and diversity

Since the 1950s, a significant amount of data has been collected at the *Station Biologique de la Tour du Valat* thanks to bird counts, netting records and field ornithologists' observations (see additional material online 1). This information was used to create a database with a line for each of the 289 avian species regularly observed in the Camargue (16). Strictly pelagic birds were not taken into account as they do not have any contact with terrestrial vertebrate species. Quantitative data was completed on the number of birds (abundance) and number of bird species (diversity) observed monthly in the Camargue. Three categories of migrating birds were considered depending on the area where they come from: incoming birds from Sub-Saharan Africa in spring, and those arriving in the Camargue in autumn coming either from continental Europe or from Scandinavian and Siberian tundra and taiga. Analyses were performed for all species and separately for species of the Anatidae family (ducks, swans, geese) and waders (shorebirds of the families Scolopacidae and Charadriidae).

## **Inter-specific bird cohabitation**

Regular bird counts provide information on the bird populations using the studied area and therefore give an idea of potential inter-specific contacts between species that share similar biotopes. Since September 1964, the Camargue duck and coot populations have been estimated every winter (17). The count was made monthly by the same observer from a plane flying at an altitude of 200 feet. It was done on Tuesday, after the 15th of the current month, except when weather conditions did not allow the plane to take off. A hundred brackish lakes and marshes used by waterbirds as resting places were counted. The arrival of the plane made birds fly off, which is necessary for detecting them and identifying their species. To count diving ducks, it was necessary to turn around the group using the plane and count them one after the other. The flight usually lasted four and a half hours. Results of the winter 2004-2005 counts were taken as an example.

## **RESULTS**

### **Bird origins from individual ringing**

Banding recoveries provide a valuable insight into the origins and dispersion areas of bird species. Maps presented in Figure 2 indicate that some birds tagged in the Camargue were recaptured the following years in very distant areas such as Iceland, Siberia, Kazakhstan, Altai or Sub-Saharan Africa. For Common coots and Common snipes, banding recoveries were all from Continental Europe and Mediterranean areas whereas Mallards and Common teals were also found in more northern places from the former Soviet Union and Scandinavia. The pattern was slightly different for Tufted ducks with more than 40% of the recoveries located in areas of taiga and tundra. Garganeys were re-captured in very distant places far north (Siberia, Finland), far east (Kazakhstan, Altai) and far south (Senegal, Mali) of the Camargue. In contrast to the previously described species, Purple heron rings were recovered only from areas located south, including four countries in the Guinea Gulf in Africa (Benin, Côte d'Ivoire, Ghana and Sierra Leone). These few maps distinguish three broad categories of areas from which Mediterranean waterbirds come: Continental Europe, northern Siberian and Scandinavian areas, and Sub-Saharan Africa. They illustrate the fact that western Mediterranean wetlands receive birds from a wide geographic range: all European countries but also other areas in the Mediterranean Basin, Central and Northern Asia and Sub-Saharan Africa.

### **Migratory bird abundance and diversity**

Monthly abundance and diversity in the Camargue are presented respectively in Figures 3a and 3b for birds coming from the three major areas of provenance described above. These figures show how many birds there are in the Camargue, just like monthly photographs of bird populations. Detailed data are available (additional material online 2).

### *General comparison of abundance and diversity*

Birds that spend time in Sub-Saharan Africa and Continental Europe are very similar to each other in terms of abundance and diversity with respectively 111 and 135 species observed in the Camargue throughout the year. Comparatively, fewer birds come from Arctic areas (only 53 species). For Anatidae species however, birds originating from Sub-Saharan Africa are a minority. Indeed, only three duck species travel as far as Sub-Saharan Africa: the Northern pintail (*Anas acuta*), the Garganey and the Northern shoveler (*Anas clypeata*). Abundance and diversity are high for both the other categories of Anatidae birds, especially those coming from Siberia and Scandinavia (17 species *versus* 9 species coming from Continental Europe). For waders, abundance and diversity are similar for Siberian and Sub-Saharan birds (respectively 21 and 24 species for a whole year). Indeed, most individuals in these species travel annually between Siberia and Africa.

### *Birds coming from Sub-Saharan Africa*

The peak in abundance occurs successively in April-May and August-September and the minimum from November to February. Diversity reaches its highest point in April-May and in September-October, generally remaining high between June and August. As a whole, birds that travel to Sub-Saharan Africa become suddenly and simultaneously abundant and diverse in spring. They are still numerous in summer and decrease in winter. The pattern is very different for ducks: the three species that fly south to tropical Africa are passage visitors, which explains why numbers remain very low. The scenario is the same for waders as they are also passage visitors but, this time, numbers and specie diversity are high.

### *Birds coming from northern areas of tundra and taiga*

Abundance is highest in April and October-November with a higher peak in autumn, notably because of juvenile birds. Diversity is high during the winter and low from May to July. It is the opposite of what was observed for Sub-Saharan species. This pattern is even clearer for birds of the Anatidae family: they are abundant from October to January and in very small numbers between March and September. In contrast to ducks, waders are mainly transient visitors and only a few individuals spend the winter in the Camargue. Their number is greatest in spring and autumn. Diversity and abundance are maintained all year long, even in winter.

### *Birds coming from Continental Europe*

The greatest number of birds that spend time in Continental Europe is observed between February and April and later between September and November. Abundance is lowest from May to July. Diversity remains high all year round with a peak in spring and another one in autumn, due to migrating passage visitors. The pattern observed for Anatidae species is the same as the one we described for Arctic species: birds are abundant in autumn and winter and

in very small numbers in spring and early summer. Diversity remains stable with seven to nine species present. Indeed, in species such as the Mallard or the Red-crested pochard (*Netta rufina*), some individuals are sedentary whereas others are migrants. Observations are the same for waders: they show a constant level of diversity and a pattern of abundance similar to Arctic species.

### **Inter-specific bird cohabitation**

The results of the winter 2004-2005 waterfowl counts are presented in Figure 4 for the species mentioned in the methods section. Other species are also present, like the Northern pintail or the Common shelduck (*Tadorna tadorna*). Garganeys are present in small numbers in September and February-March but they cannot be distinguished from Common teals from the airplane. These counts show that numerous species, with various migratory patterns, share the same wetlands during the long winter period. Most of them are still present in March, when the first African migratory birds are already back to breed in the Camargue or make a stop for refueling before flying further north. For instance, as many as 11,550 Black-tailed godwits (*Limosa limosa*) were counted in the Camargue in March 2005. Moreover, the movement and abundance of birds vary greatly from one year to another because of movements influenced by meteorological conditions. For example, there were about 60,000 ducks in the Camargue in March 2005 compared to only 40,000 the previous year when meteorological conditions in Europe were warmer.

## **DISCUSSION**

Maps of ring recoveries and graphs of monthly variations in bird abundance and diversity show that western Mediterranean wetlands such as the Camargue are a hub for birds from all origins (Central Asia, Siberia, Northern and Eastern Europe, Western Africa and Mediterranean basin) and that numerous birds of various species are seasonally aggregated in similar habitats. Under the hypothesis that pathogen dispersion risk into the Camargue is correlated to the number of birds and bird species encountered in a given area, these indices are helpful to determine periods at higher risk for avian-borne diseases introduction and emergence. We recall that these empirical estimates are skewed, which is briefly discussed with the perspectives below.

### **Periods of higher risk of pathogen introduction**

#### *Birds coming from Sub-Saharan Africa*

African pathogen introduction risk in Mediterranean wetlands would be highest between March and July (Table), which successively corresponds for birds with spring migration and breeding. Conversely, in autumn, birds return to Africa and are more likely to introduce pathogens originating from the North than from the South.

Out of the approximately 100 species that come every year to the Camargue from different countries of Sub-Saharan Africa, most are insectivorous passerines which spend winter in Africa and breed in Europe. Among aquatic birds, waders are the most numerous and are the most likely to be responsible for the introduction of pathogens with an epidemiological cycle associated to wetlands. Consequently, AI viruses, which have water-borne transmission, seem more likely to be introduced from Africa in spring by waders than by ducks. Indeed, only three duck species travel to Sub-Saharan Africa whereas waders fly in large numbers to spend the winter on the African continent. WN virus, which is transmitted by arthropod vectors, could potentially be introduced by any species of bird that comes from endemic areas in Africa and is exposed to mosquito or tick bites (18). Insectivorous passerines, being the majority, can be particularly suspected. This scenario could explain why an outbreak occurred in Camargue horses in 2000 while the virus had not been observed there since the 1960s (19).

*Birds coming from northern areas of tundra and taiga*

Pathogens may be introduced into Mediterranean wetlands by birds coming from northern areas of Scandinavia and Siberia. The risk would be higher between September and December when Arctic bird abundance reaches its peak (Table). In spring, the northern birds observed in the Camargue have recently spent a long time in southern lands so that their associated probability of introducing pathogens originating from Scandinavia or Siberia is rather low. Waterbirds and granivorous passerines, which do not need to fly further south to find food supplies throughout the cold season, could introduce pathogenic microorganisms that would be transmitted later between wintering birds easier as densities are high. Waders, which migrate from Siberia and make a stopover in autumn before crossing the Mediterranean sea, could contaminate other bird species before pursuing their flight. As a whole, 53 species seen in the Camargue come from Arctic areas, which is two times less than the number of species that come from Sub-Saharan Africa or Continental Europe. As a result, the probability for pathogens to be introduced from Arctic areas should be lower than from birds of these two other categories. Another scenario can nevertheless be suspected if birds coming from northern areas disseminate a pathogen all along their migration route: then, this pathogen would also infect Continental European species and the probability of its introduction in Mediterranean wetlands would depend on the arrival of both Arctic and Continental birds. AI viruses are likely to be introduced in autumn by waterbirds (ducks and waders) that breed in Northern Europe and Siberia, especially since numbers are high because of the presence of juveniles. Furthermore, young ducks born during the year have been suspected of being privileged carriers for AI viruses (5, 20). Conversely, WN virus has never been described in Scandinavia and Siberia, probably because the transmission cycle cannot be maintained in these northern biotopes.

### *Birds coming from Continental Europe*

Autumn and winter are the two seasons during which the transmission of bird pathogens originating from Continental Europe would be the most likely (Table). Indeed, in spring, the introduction of pathogens from Continental Europe is less probable as birds have been absent from this area for five or six months. As previously seen, up to 135 species are susceptible to introduce pathogenic agents in the Camargue. Granivorous passerines, birds of prey and waterfowl are among the species that come in numbers to take advantage of Mediterranean wetlands' temperate climate during winter. Aquatic birds, which need unfrozen water-ponds to feed, show variations in their movements depending on meteorological conditions. For instance, if a cold spell occurs in Eastern or Northern Europe, the number of Green-winged teals in the Camargue increases (17). Surveys among wild waterbirds in Europe have revealed that AI viruses are frequently found (21-24), which means that waterbirds arriving from Continental Europe might often be carriers of AI viruses. Similarly, as WN virus activity was recently reported in Romania (25) and the Czech Republic (26), wild birds migrating in autumn from these countries to the Mediterranean basin could introduce WN virus, either because of a high viremia level, or because they carry infected ectoparasites. If the virus managed to overwinter in a reservoir host or a vector, it could then be responsible for an outbreak the following summer when mosquito vectors are abundant (27).

### **Bird-to-bird pathogen transmission risk**

Several factors are important regarding bird-to-bird transmission risk. These include bird abundance or density, bird diversity, bird sensitivity to pathogens, inter-specific interactions, and environmental conditions (14). In disease ecology, all these factors are included in the basic reproduction number  $R_0$  defined as the mean number of new infections arising from an index infected bird. The  $R_0$  associated to an ecosystem of pathogens, hosts, and their environment, is the key parameter in assessing the transmission potential and the persistence of pathogens or infected vectors.

For water-transmitted pathogens such as AI viruses, transmission risk may be associated to the number of birds congregated in a same water-pond, particularly in autumn and winter (Figure 4). This crowding of wintering species, in addition to the permanent presence of a transient population of birds using wetlands to stop off during migration, could allow AI viruses to circulate and be maintained thanks to a rapid dissemination on shared water. For vector-transmitted pathogens like WN virus, transmission possibilities depend both on the bird reservoir density and on the dispersion abilities and activity periods of the arthropod vectors.

The risk of disease inter-specific transmission is all the more problematic since wild and domestic species are involved. Ducks are the most likely aquatic birds to come in contact with free range poultry, especially because the presence of congeners can induce migrating wild

ducks to stop. Captive bred Mallards, used for hunting purposes and voluntarily put in the wild to attract other ducks, are particularly likely to share pathogens with their migratory congeners and facilitate the transmission of diseases to other domestic species. The risk is different for domestic chickens or turkeys which are more likely to have contact with granivorous birds. Waders on the contrary are rarely in direct contact with human-raised species.

It is noteworthy that bird-carried pathogens are above all susceptible to being spread worldwide because of human activities such as legal or illegal trade of wild and domestic birds or bird products (28). The mechanism for the introduction of WN virus in America in 1999 is not known with certainty but one plausible scenario is the importation of an infected bird (29, 30). Similarly, the highly pathogenic AI strain H5N1 was isolated in Belgium from Crested hawk-eagles (*Spizaetus nipalensis*) smuggled by air travel (31). In Asia, transmission of H5N1 influenza virus has mainly been the result of human activity such as live-poultry markets and the international trade of birds, bird products or contaminated equipment (32-35).

### **Methodological concerns and perspectives**

It is worthwhile to recall that the ornithological data presented in this article are merely crude estimates. Recoveries of banded individuals, for instance, are known to be subject to strong biases related to where and when the banding effort was done but also due to high variability in the probability of reporting marked animals among areas (36). Similarly, the presented estimates of bird abundance and diversity are basic indices associated to the number of individuals heard, seen or caught in the Camargue (see additional material online 1). They do not take into account two important sources of error: detection error, related to the fact that the probability of detecting a bird is lower than one, and survey error, associated to spatial and temporal variability (37). As our motivations were merely to show that information already available on birds may lead to better understanding animal and human health issues associated to bird-borne pathogens, these biases do not invalidate the objectives of this paper.

The results obtained were helpful to identify key groups of species likely to introduce pathogens from a given area at a given time of year. We voluntarily chose to focus on birds and leave pathogens aside, but studies of diseases in natural bird populations are obviously critically needed. Ecology, the science of interactions between living organisms and their physical environment, has been extended to include microorganisms. Understanding the relationships between organisms (such as hosts, pathogens, predators, competitors) and their environment is the aim of disease ecology. As it is extremely complex to study the dynamics of systems with many hosts and pathogenic agents, efforts should primarily focus on a few specific bird-pathogen models.

Mathematical modeling may help to make predictions on specific bird-pathogen interactions and to identify key parameters that need to be better estimated through additional

research. Long-term records enable databases to be established, which would illustrate bird-pathogen relationships in natural conditions. These data would focus on hosts, their migration, population age, behavior and so forth. Host-pathogen interactions should be described using data such as antibody prevalence in different age classes, frequency of virus isolation, characterization of the strains involved. Complementary laboratory and field experiments within a controlled environment might also provide relevant information. All these investigations should gradually make it possible to gather valuable baseline data to test specific hypotheses and gain new insights in bird-pathogen relationships in Mediterranean wetlands.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank the CNES (French National Center for Spatial Studies) and the INRA (French National Institute for Research in Agronomy) who financially supported this work as part of the Spatial Surveillance of Epidemics (S2E) Project. We are thankful to all the ornithologists who took part in bird counts without whom bird abundance and diversity in the Camargue could not have been estimated. We thank L. Hoffmann and A. Johnson who successively wrote annual reports on bird banding recoveries between 1950 and 1975 at the Station Biologique de la Tour du Valat. We are grateful to C. Farmer, from the College of Veterinary Medicine of Lyon, who kindly accepted to critically read our manuscript. We also thank our reviewers for fruitful comments.



**REFERENCES**

- (1) Berthold P. Bird Migration. A General Survey. Oxford, UK: Oxford University Press; 1993.
- (2) Reed KD, Meece JK, Henkel JS and Shukla SK. Birds, migration and emerging zoonoses: West Nile virus, Lyme disease, influenza A and enteropathogens. *Clin Med Res.* 2003;1:5-12.
- (3) Hubalek Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. *J Wildl Dis.* 2004;40:639-59.
- (4) Alexander DJ. A review of avian influenza in different bird species. *Vet Microbiol.* 2000;74:3-13.
- (5) Krauss S, Walker D, Pryor SP, Niles L, Chenghong L, Hinshaw VS, et al. Influenza A viruses of migrating wild aquatic birds in North America. *Vector-borne and zoonotic diseases.* 2004;4:177-89.
- (6) Tracey JP, Woods R, Roshier D, West P and Saunders GR. The role of wild birds in the transmission of avian influenza for Australia: an ecological perspective. *Emu.* 2004;104:109-24.
- (7) Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenström J, Osterhaus ADME and Fouchier RAM. Global patterns of Influenza A virus in wild birds. *Science.* 2006;312:384-8.
- (8) Easterday BC, Hinshaw VS and Halvorson DA. Influenza. In: B. W. Calnek, B. W. Calneks. *Diseases of poultry.* Ames, Iowa, USA: Iowa State University Press; 1997. p. 583-605.
- (9) Hurlbut HS. West Nile virus infection in arthropods. *Am J Trop Med Hyg.* 1956;5:76-85.
- (10) Work TH, Hurlbut HS and Taylor RM. Indigenous wild birds of the Nile Delta as potential West Nile virus circulating reservoirs. *Am J Trop Med Hyg.* 1955;4:872-88.
- (11) Malkinson M and Banet C. The role of birds in the ecology of West Nile virus in Europe and Africa. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2002;267:309-22.
- (12) Rappole JH, Derrickson SR and Hubalek Z. Migratory birds and spread of West Nile virus in the Western Hemisphere. *Emerg Infect Dis.* 2000;6:319-28.
- (13) Grenfell BT and Dobson AP. *Ecology of infectious diseases in natural populations.* Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1995.
- (14) Hudson PJ, Rizzoli A, Grenfell BT, Heesterbeek H and Dobson AP. *The ecology of wildlife diseases.* Oxford, UK: Oxford University Press; 2002.
- (15) Thomas F, Renaud F, Guégan J-F. *Parasitism and ecosystems.* Oxford, UK: Oxford University Press; 2005.
- (16) Kayser Y, Girard C, Massez G, Chérain Y, Cohez D, Hafner H, et al. [Camargue ornithological report for the years 1995-2000] (in French). *Revue d'Ecologie (Terre & Vie).* 2003;58:5-76.
- (17) Tamisier A and Dehorter O. [Camargue, ducks and coots. Functioning and gradual change of a prestigious wintering ground] (in French). Nîmes, France: Centre Ornithologique du Gard; 1999.
- (18) Lawrie CH, N.Y. U, E.A. G and Nuttal PA. Ixodid and Argasid tick species and West Nile virus. *Emerg Infect Dis.* 2004;10:653-57.
- (19) Murgue B, Murri S, Zientara S, Durand B, Durand JP and Zeller H. West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years. *Emerg Infect Dis.* 2001;7:692-6.
- (20) Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM and Kawakami Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev.* 1992;56:152-79.
- (21) Hannoun C and Devaux JM. Circulation of Influenza viruses in the Bay of the Somme river (in French). *Comp Immun Microbiol Infect Dis.* 1980;3:177-83.
- (22) Suss J, Schafer J, Sinnecker H and Webster RG. Influenza virus subtypes in aquatic birds of eastern Germany. *Arch Virol.* 1994;135:101-14.

- (23) Fouchier RA, Olsen B, Bestebroer TM, Herfst S, van der Kemp L, Rimmelzwaan GF, et al. Influenza A virus surveillance in wild birds in Northern Europe in 1999 and 2000. *Avian Dis.* 2003;47:857-60.
- (24) De Marco MA, Foni E, Campitelli L, Raffini E, Delogu M and Donatelli I. Long-term monitoring for avian influenza viruses in wild bird species in Italy. *Vet Res Commun.* 2003;27 Suppl 1:107-14.
- (25) Campbell GL, Ceianu CS and Savage HM. Epidemic West Nile encephalitis in Romania: waiting for history to repeat itself. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;951:94-101.
- (26) Hubalek Z, Halouzka J and Juricova Z. West Nile fever in Czechland. *Emerg Infect Dis.* 1999;5:594-5.
- (27) Jourdain E, Toussaint Y, Leblond A, Bicout DJ, Sabatier P and Gauthier-Clerc M. Bird species potentially involved in introduction, amplification and spread of West Nile virus in a Mediterranean wetland, the Camargue (southern France). *Vector-borne and zoonotic diseases.* 2007; in press.
- (28) Karesh WB, Cook RA, Bennett EL and Newcomb J. Wildlife trade and global disease emergence. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:1000-2.
- (29) Rappole JH and Hubalek Z. Migratory birds and West Nile virus. *J Appl Microbiol.* 2003;94 Suppl:47S-58S.
- (30) Gould EA. Implications for Northern Europe of the emergence of West Nile virus in the USA. *Epidemiol Infect.* 2003;131:583-9.
- (31) Van Borm S, Thomas I, Hanquet G, Lambrecht B, Boschmans M, Dupont G, et al. Highly pathogenic H5N1 influenza virus in Smuggled Thai Eagles, Belgium. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:702-5.
- (32) Bridges A. Bird flu fails, for now, to migrate. ProMed. Accessed at <http://www.promedmail.org>. Archive number: 20051228.3700.
- (33) Sims LD, Domenech J, Benigno C, Kahn S, Kamata A, Lubroth J, et al. Origin and evolution of highly pathogenic H5N1 avian influenza in Asia. *The Veterinary Record.* 2005;157:159-64.
- (34) Webster RG. Wet markets--a continuing source of severe acute respiratory syndrome and influenza? *Lancet.* 2004;363:234-6.
- (35) Melville DS and Shortridge KF. Influenza: time to come to grips with the avian dimension. *Lancet Infect Dis.* 2004;4:261-2.
- (36) Williams BK, Nichols JD and Conroy MJ. Analysis and management of animal populations. San Diego, CA, USA: Academic Press; 2002.
- (37) Yoccoz NG, Nichols JD and Boulinier T. Monitoring biological diversity in space and time. *Trends in Ecology and Evolution.* 2001;16:446-53.

## FIGURE LEGEND

**Figure 1:** Map of the main Mediterranean wetlands (sites number 1, 2, 11, 12, 13, 14 are considered as western Mediterranean wetlands).

**Figure 2 :** Maps showing the countries (or regions for the ex-USSR) in which birds ringed in the Camargue were re-captured for seven species (n = number of ring recoveries and m = number of marked individuals): (a) Mallard (*Anas platyrhynchos*), n=434, m=13176; (b) Green-winged teal (*Anas crecca*), n=3903, m=58347; (c) Garganey (*Anas querquedula*), n=181, m=2436, (d) Tufted duck (*Aythya fuligula*), n=313, m=3845; (e) Common coot (*Fulica atra*), n=99, m=7866; (f) Purple heron (*Ardea purpurea*), n=39, m=5017; (g) Common snipe (*Gallinago gallinago*), n=54, m=2445.

### Figure 3

(a) Monthly abundance in the Camargue of birds coming from Siberia/Scandinavia, Continental Europe and Sub-Saharan Africa respectively for (1) all species, (2) species of the Anatidae family and (3) waders.

(b) Monthly diversity in the Camargue of birds coming from Siberia/Scandinavia, Continental Europe and Sub-Saharan Africa respectively for (1) all species, (2) species of the Anatidae family and (3) waders.

### Figure 4

Cumulative number of the most abundant waterfowl species recorded in the Camargue during winter 2004-2005: Mallard (*Anas platyrhynchos*), Northern shoveler (*Anas clypeata*), Green-winged teal (*Anas crecca*), Eurasian wigeon (*Anas penelope*), Gadwall (*Anas strepera*), Red-crested pochard (*Netta rufina*), Common pochard (*Aythya ferina*), Tufted duck (*Aythya fuligula*) and Common coot (*Fulica atra*).

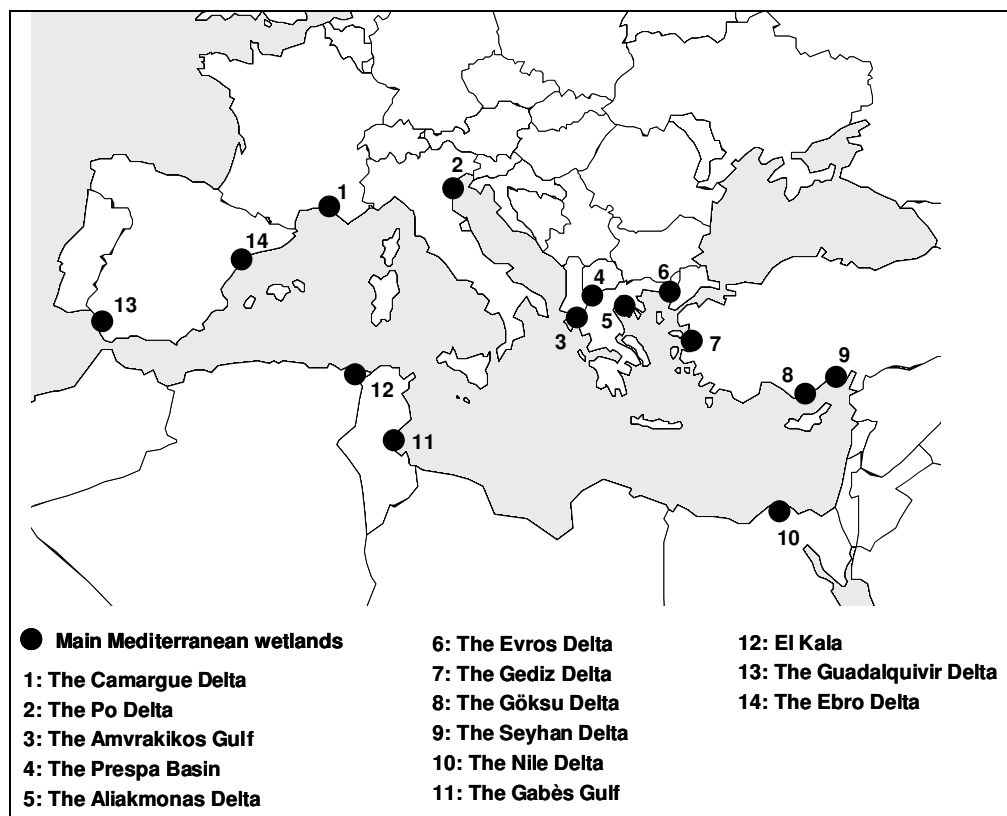


Figure 1

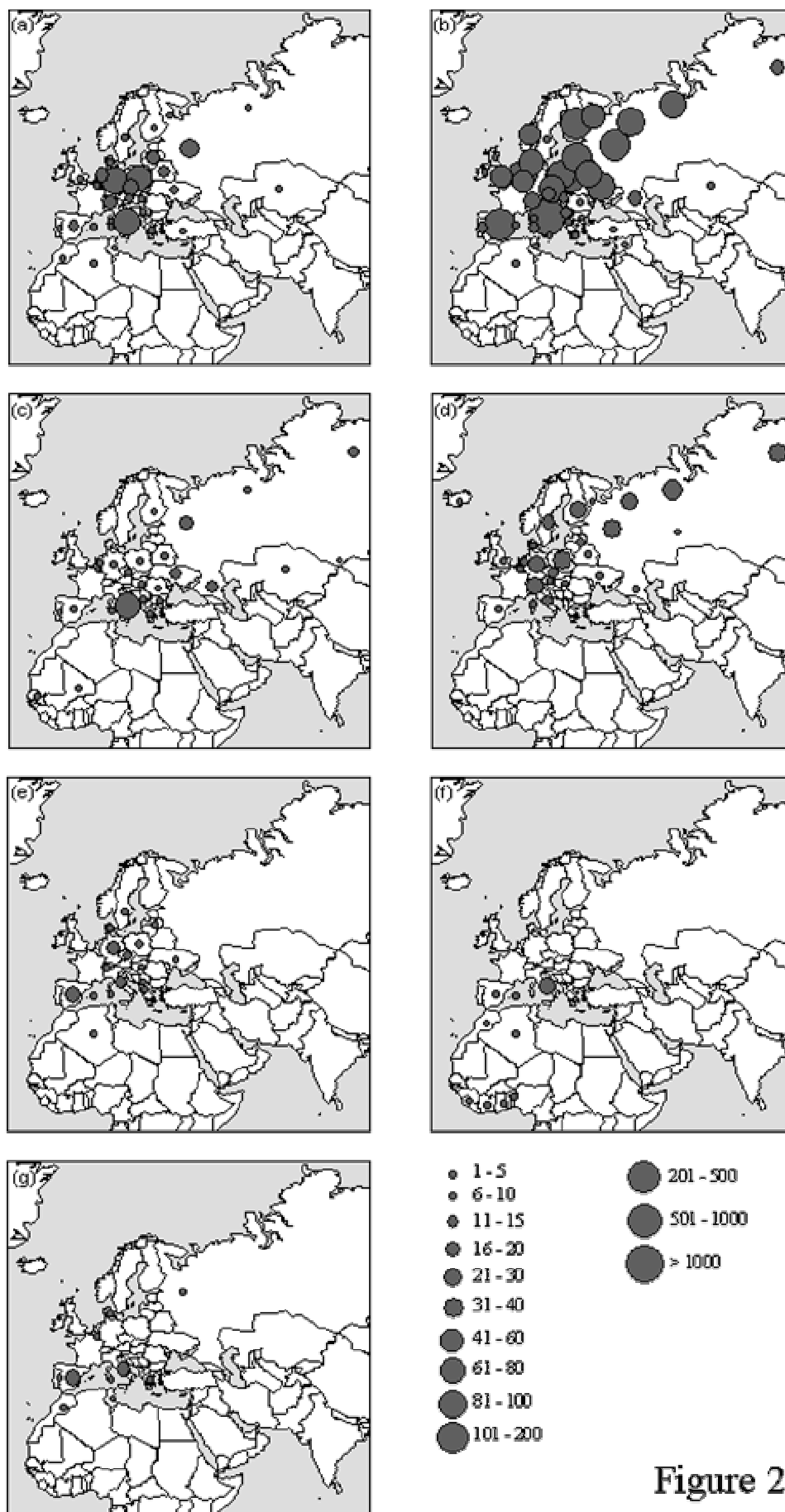


Figure 2

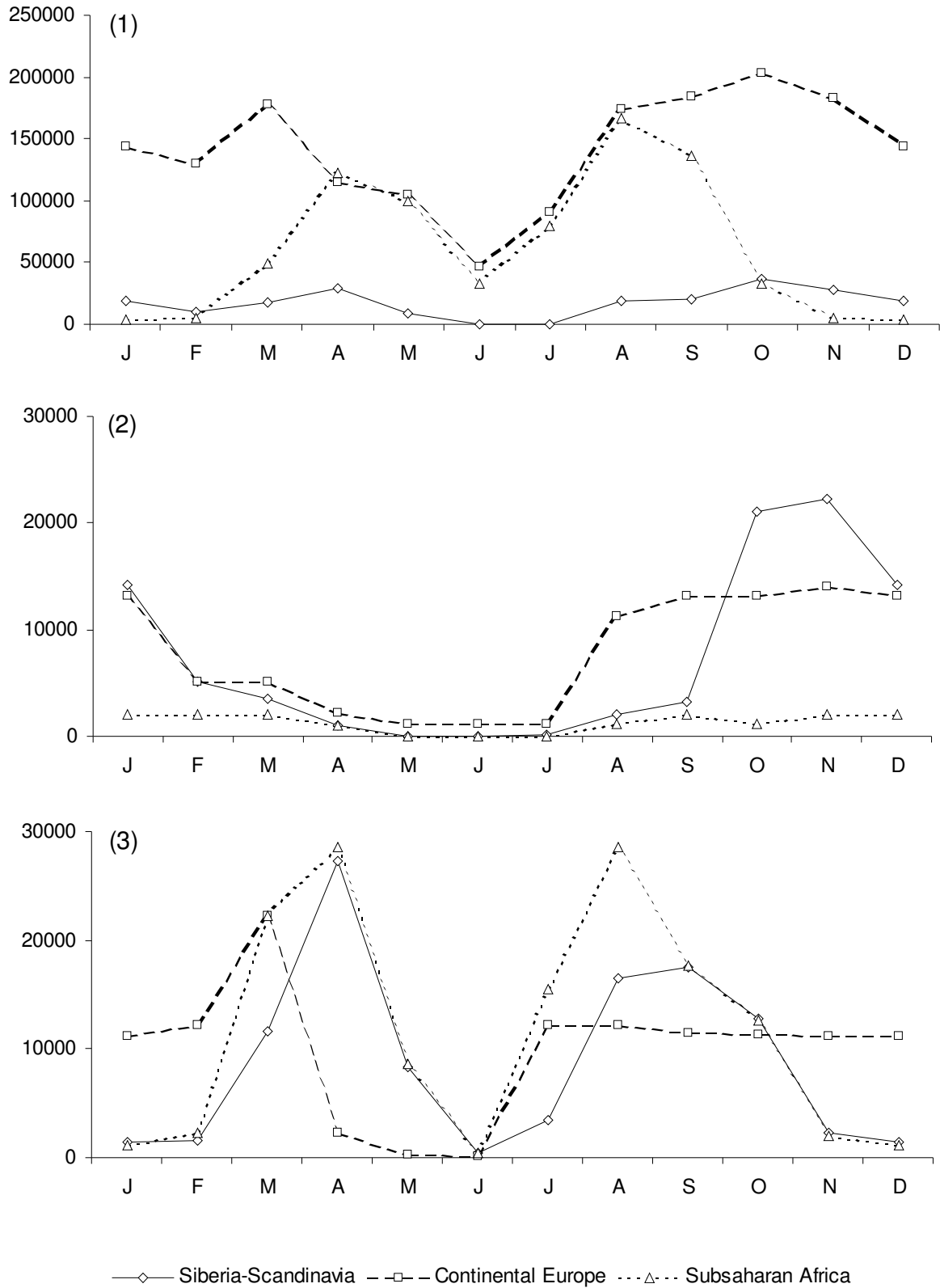


Figure 3a

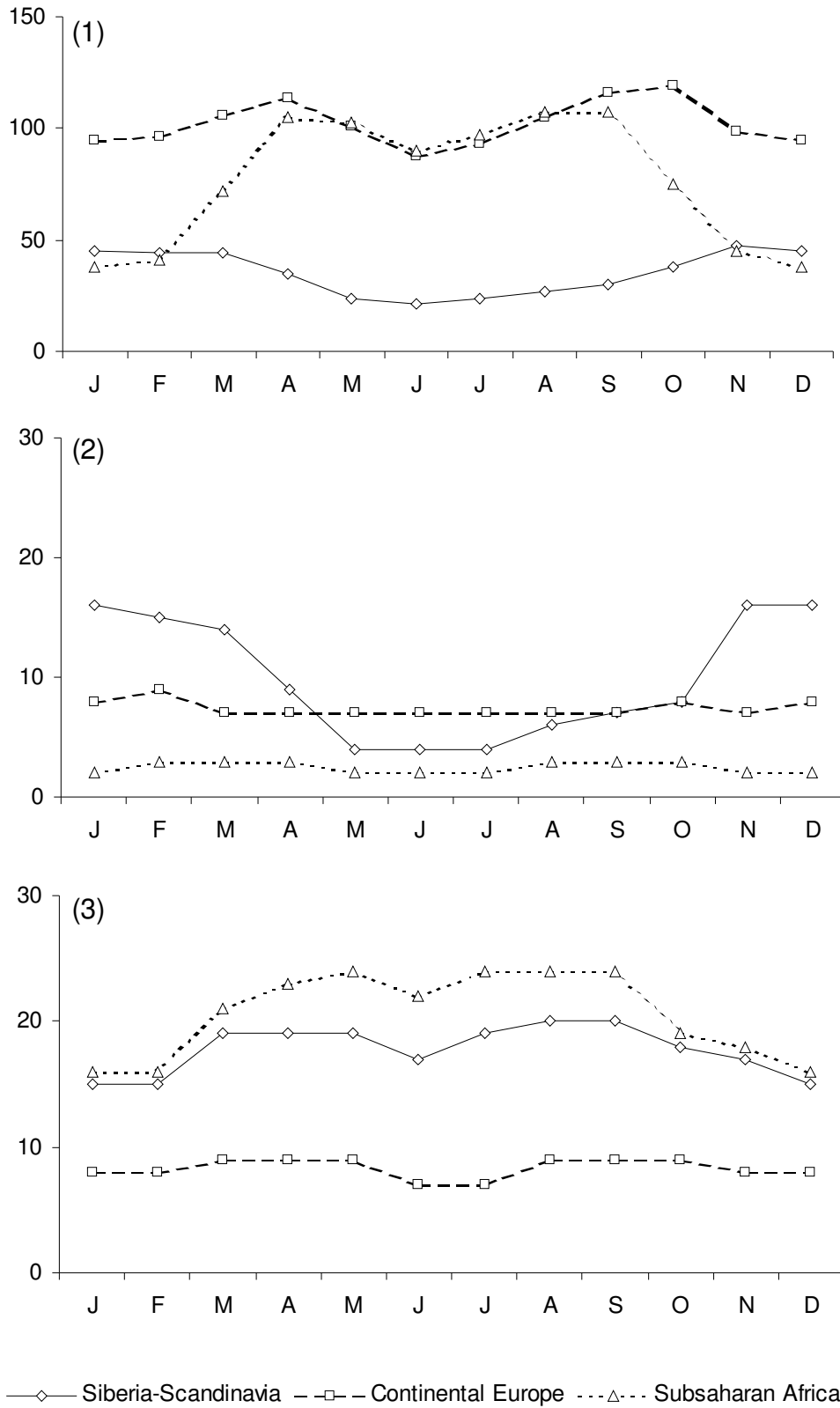


Figure 3b

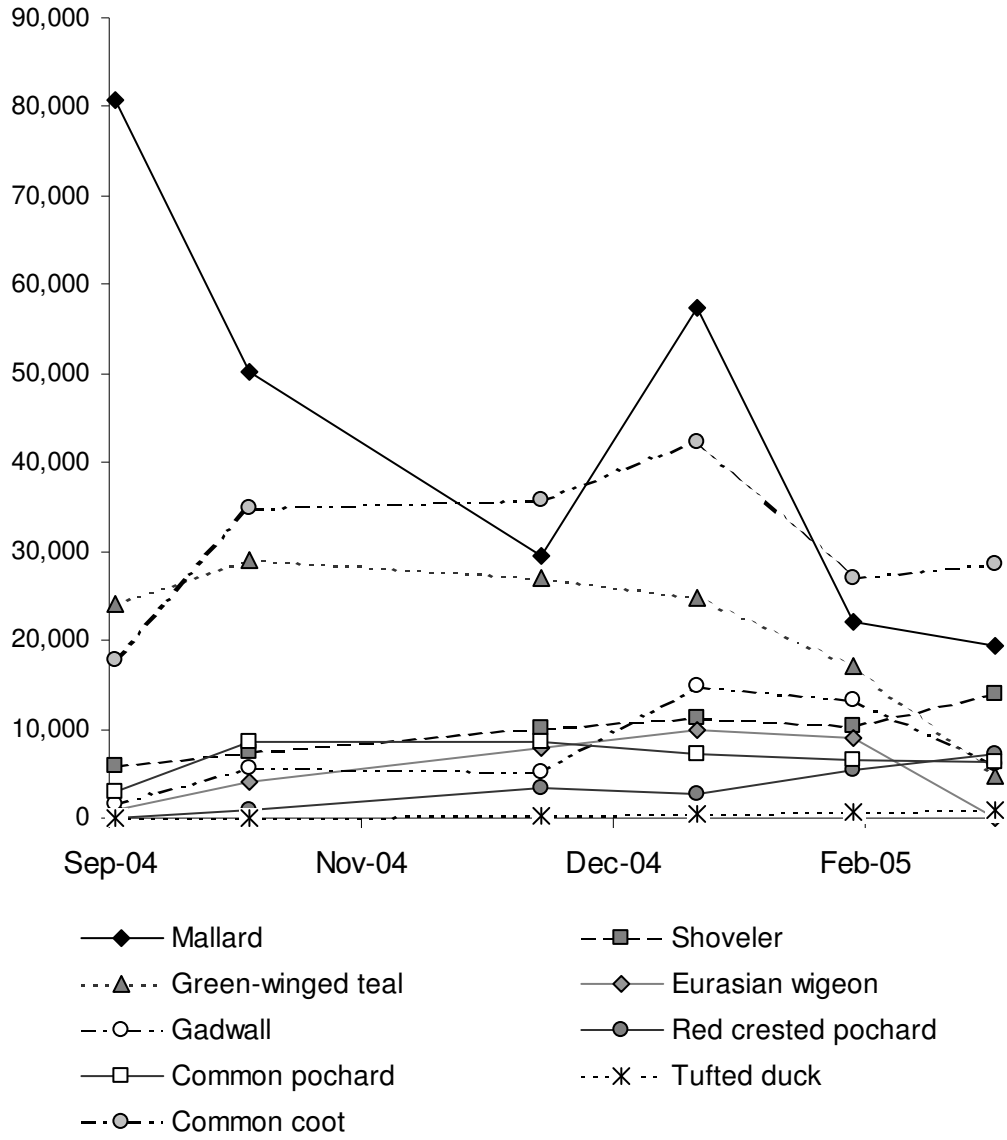


Figure 4



**TABLE**

Periods of major risk for pathogen introduction in the Camargue from Sub-Saharan Africa, Siberia-Scandinavia or Continental Europe respectively for all species, Anatidae species and waders. The risk is supposed to increase both with the number of species and the number of individuals present in the Camargue (++: very high, +: high, +/-: medium, -: low). In addition, the timing of migration does matter since the introduction of pathogens from Africa (Eurasia) during the autumn (spring) migration is less likely because birds do not come directly from these areas. The corresponding risks have therefore been put between parentheses.

<b>Origin</b>	<b>Species</b>	<b>Spring</b>	<b>Summer</b>	<b>Autumn</b>	<b>Winter</b>
Sub Saharan Africa	All species	++	+	(+/-)	(-)
	Waterfowl	+/-	-	(+/-)	(-)
	Waders	++	+	(+)	(-)
Scandinavia/Siberia	All species	(+/-)	(-)	++	+
	Waterfowl	(-)	(-)	++	++
	Waders	(+)	(+/-)	++	+/-
Continental Europe	All species	(+/-)	(-)	++	+
	Waterfowl	(-)	(-)	++	++
	Waders	(+)	(-)	++	+

**APPENDIXES****Additional material online 1**

List for each bird genus of the census methods used in the Camargue since the 1970s.

**Additional material online 2**

Database indicating for each of the 289 bird species regularly observed in the Camargue the area from where they come, the months during which they are present and their average monthly numbers. In the *Areas from where birds come* section, "1" means that the considered species usually comes from the corresponding area. In the *Bird diversity* section, "1" means that the considered species is present in the Camargue during the corresponding month and "0" that it is not present. In the *Bird abundance* section, the monthly number of birds is indicated for each species as: 0, 10, 100, 1,000 or 10,000.

**Oiseaux candidats à l'introduction,  
l'amplification et la dispersion du virus  
West Nile en Camargue**

---

***Article 2***

---

Article accepté  
*Revue : Vector Borne and Zoonotic Diseases*

***Bird species potentially involved in introduction,  
amplification and spread of West Nile virus in a  
Mediterranean wetland, the Camargue  
(southern France)***



## **Bird Species Potentially Involved in Introduction, Amplification and Spread of West Nile Virus in a Mediterranean Wetland, the Camargue (Southern France)**

E. Jourdain<sup>1,2</sup>, Y. Toussaint<sup>1,2</sup>, A. Leblond<sup>2</sup>, D. J. Bicout<sup>2</sup>, P. Sabatier<sup>2</sup>, M. Gauthier-Clerc<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Station Biologique de la Tour du Valat, Le Sambuc, F-13200 Arles, France

<sup>2</sup> Biomathématiques et épidémiologie (EPSP-TIMC, UMR 5525), Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, 1 avenue Bourgelat, F-69280 Marcy l'Etoile, France

### **Suggested running head**

Birds and West Nile Virus in the Camargue

### **WORD COUNT:**

Abstract: 144

Text: 4965

## **ABSTRACT**

West Nile virus (WNV) is a mosquito-transmitted Flavivirus with a transmission cycle involving birds as amplifying hosts. Wild birds are also believed to carry WNV over large distances and are able to introduce it into new areas during migration and dispersal. In this paper, our objective is to provide lists of birds potentially involved in the introduction, the amplification and the spread of WNV in the Camargue, a Mediterranean wetland in the south of France where several WNV outbreaks have occurred since the 1960s. Bird species were classified according to the following ecological factors: migratory status and provenance area, used biotopes, abundance and period of presence in the Camargue. The obtained lists of bird species potentially involved in the introduction, amplification and spread of WNV should prove useful to determine target species on which further studies on WNV ecology in birds could be focused.

## **KEYWORDS**

Wild birds, West Nile, Epidemiology, Migration, Amplification, Spreading, Camargue

## INTRODUCTION

First described in Uganda in 1937 (Smithburn et al. 1937), West Nile virus (WNV) is an arbovirus of the genus *Flavivirus*, family Flaviviridae. Responsible for infections in humans and horses, the virus has a transmission cycle involving mosquitoes as vectors and birds as amplifying hosts (Work et al. 1955; Taylor et al. 1956). Even before its introduction in North America (CDC 1999), WNV was recognized as the most widespread of the flaviviruses, with geographic distribution including Africa and Eurasia (Hubalek and Halouzka 1999). It is considered endemic in many areas of tropical Africa (Murgue et al. 2002). In Europe, several outbreaks have recently occurred in horses and humans in different countries (Murgue et al. 2002; Del Giudice et al. 2004) including Romania (1996), Italy (1998), Russia (1999) and France (2000, 2003, 2004).

In France, the first reported outbreak of West Nile (WN) fever in horses and humans occurred in 1962 in the Rhône delta, near the Mediterranean coast. After 1967, no clinical evidence of WNV infection was reported, but a serosurvey conducted on horses and humans between 1975 and 1976 showed a low frequency of antibody response against WNV (Rollin et al. 1982). Conversely, serological investigations performed on 80 wild birds (Yellow-legged Gull *Larus cachinnans*, Black-headed Gull *L. ridibundus*, Greater Flamingo *Phoenicopterus ruber*, Jackdaws *Corvus monedula*) were all negative (Rollin et al. 1982). No other outbreak of WN fever was reported until the end of August 2000 when 76 equine cases occurred, among which 21 were fatal (Murgue et al. 2001). Subsequent serological investigations showed that more than 400 horses had been in contact with the virus and that the hot spot was not located in the wet part of the Camargue, but several kilometers to the north, in a rather dry area (Durand et al. 2002). No human cases were recorded (Dauphin et al. 2004) but antibodies were found in the blood of healthy gamekeepers living in the area (Murgue et al. 2001). Neutralizing antibodies were also found in a few Mallards *Anas platyrhynchos*, Yellow-legged Gulls *L. cachinnans* and Common Magpies *Pica pica* but no abnormal mortality was detected among bird populations (Hars et al. 2004). Serological surveillance of horses (Bicout et al. 2003) and sentinel domestic birds (Hars et al. 2005) revealed that the virus circulated during summer 2001 and 2002 without the diagnosis of clinical cases. In late July 2004, a new outbreak occurred in the Camargue, close to les Saintes Maries de la Mer (Zeller et al. 2004). By the end of October, 32 cases in horses, including seven fatalities or euthanasia, were confirmed (Zeller et al. 2004).

The Camargue, one of the foremost conservation areas in Europe, appears to be a privileged area for the WNV transmission cycle. Even if the epidemiology remains unclear, birds are known to take part in various aspects of WNV circulation (McLean et al. 2001; Malkinson and Banet 2002). Because of the high diversity of bird species, a systematic approach that takes all species into account and classifies them as potentially involved species in WNV circulation can prove useful. After the introduction of WNV in the western

hemisphere in 1999, birds were for instance classified depending on their migration routes in an attempt to predict the likely spread of the virus (Rappole et al. 2000). Likewise, our objective in this paper is to provide a list of birds potentially involved in the introduction, amplification and spread of WNV in the Camargue according to their migration routes but also to other ecological factors such as habitat use and abundance. These species may indeed require specific studies.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **West Nile virus transmission cycle**

Birds are central to WNV transmission cycle (Figure 1). The primary cycle, which is enzootic, involves birds as hosts for the virus and ornithophilic mosquitoes (*i.e.* mosquitoes that feed on birds mostly) as vectors (Komar 2000). Female mosquitoes get infected when they feed on a viremic bird. The virus reproduces in the mosquito vector and, after a time interval known as the extrinsic incubation period, a new bird can be inoculated. If this bird is receptive to the virus, it becomes viremic and infectious for other vectors for a period that lasts between one to seven days under laboratory conditions (Komar et al. 2003). A secondary cycle involves arthropod vectors with broader trophic preferences. They are called bridge vectors because they are able to transmit the virus to non avian hosts such as horses and humans (Turell et al. 2002). These non avian hosts are supposed to be dead-end hosts.

### **Description of the Camargue and related biotopes**

#### *The Camargue, a mosaic of habitats*

Located in the Rhône delta, the Camargue is an alluvial lowland covering some 140,000 ha (Camargue *sensu stricto*). West and north of this delta is a dry area mainly covered with typical Mediterranean vegetation, farming areas and vineyards. In this article, we focus on both these dry and wet areas which constitute the Camargue *sensu lato*. Ecosystems are highly variable between these two areas and furthermore depending on the time of the year. According to Weber and Hoffmann (1968), they are determined by four factors, namely the climate, the water, the salt and the wind. Winters are rather cool and damp whereas summers are usually sunny, warm and dry. Rainfalls are low but, in the delta, a network of irrigation and drainage canals carry fresh water from the Rhône to the fields. The salt exercises a decisive influence on flora and fauna, particularly in the southern brackish and marine area. The “sansouires”, which are periodically flooded saltmarshes covered with glasswort, are hence one of the most typical habitats of the Camargue. The wind blows for nearly half the year and is sometimes very strong for several days. As in other Mediterranean wetlands, the combination of these factors produces a wide range of habitats (Figure 2) used by the various bird species either to breed, rest or feed (Blondel and Isenmann 1981).

### *Birds seasonal movements*

Thanks to this high variety of biotopes, bird populations in the Camargue are very diversified. Their presence and abundance vary constantly because of daily but also seasonal movements. Birds' annual cycle is based on the two periods of reproduction and wintering which, for non sedentary species, are separated by migration. Migratory populations travel between tropical regions of Africa and northern or eastern areas of Eurasia (Figure 3). Depending on the species, the Camargue is either a breeding area, a migration stop-over or a wintering quarter.

### **Definition of bird classes and epidemiological scenarios**

#### *Bird classes and West Nile virus ecology*

In epidemic areas, WNV is thought to be introduced by migrating birds and maintained during the periods of mosquito abundance (Komar 2000; Rappole et al. 2000). As epizootics often occur in areas close to wetlands (Hubalek and Halouzka 1999; Rappole and Hubalek 2003), the virus could first be amplified in wet areas and later spread to dry surrounding areas. For instance, during the 2000 outbreak in the Camargue, most of the horses clinically or serologically positive for WNV were localized in dry areas (Durand et al. 2002). It was hypothesized that the emergence of the virus in these areas was the consequence of a primary amplification in waterbirds living in the wetlands of the Rhône delta.

Birds can consequently be suspected to successively play three roles in the ecology of WNV, namely introduction, amplification and spread. (a) Introductory birds are migrating birds that come from areas where WNV is either endemic or epidemic and can introduce the virus during migration. (b) Amplifying birds are birds that live in areas where ornithophilic mosquitoes are abundant and allow WNV amplification in spring and early summer. (c) Spreading birds are birds that move from wet to surrounding dry areas in late summer and might spread the virus out.

#### *Epidemiological scenarios in the Camargue*

Three main scenarios of WNV circulation in the Camargue can be suggested (Figure 4). (a) The virus may be introduced in the Camargue in spring by birds migrating from endemic areas in Africa and then amplified in wet areas before being spread out to dry areas in late summer. (b) The virus may be introduced in the Camargue in autumn by birds migrating from epidemic (or endemic) areas in eastern Europe and amplified in wet areas the next spring before being spread into dry areas. (c) The virus may be endemic in the Camargue and responsible for epizootics only when particular ecological conditions are gathered which allow amplification and spread.



### **Bird selection criteria**

The criteria considered to classify birds in species which are potentially responsible for the introduction, the amplification or the spread of WNV, were the following (Table 1): migratory status and provenance country, biotopes used, abundance and period of presence in the Camargue. The migration status was classified as accidental visitor (up to five records), casual breeder, migrant breeder, resident breeder, passage visitor and winter visitor, according to Isenmann (1993). Documentation on the countries from which birds come was found in reference ornithological handbooks (Curry-Lindhal 1981; Hagemeyer 1997; Dubois et al. 2000). Data on biotopes used, abundance indexes and periods of presence were gathered from observations recorded by ornithologists at the Station Biologique de la Tour du Valat since the 1950s. A data base compiling these criteria for each of the 289 avian species regularly observed by ornithologists in the Camargue (Kayser et al. 2003) was created using Microsoft Excel software (Microsoft Corp., Redmon, WA).

### **RESULTS**

A list of 150 bird species potentially involved in WNV introduction, amplification or spread in the Camargue is presented in Table 2.

#### **List of introductory birds**

The number of potentially responsible species for WNV introduction under our hypotheses is high (n=122) and reveals that about 40% of the species regularly observed in the Camargue might be involved (Table 3). More precisely, 111 species, mostly passerines and shorebirds that come into the Camargue either to breed or to make a stopover before flying further north, could introduce the virus in spring from the African continent. In addition, 87 bird species that breed in eastern Europe could bring WNV into the Camargue between August and October. Among them, 53 species arrive early in August. Some of these species are passage visitors that make a stop during the autumn migration but others, like ducks, remain in the Rhône delta during the winter. Interestingly, among these 122 introductory species, 41 have been found with antibodies specific to WNV in the Old World (Table 2). WNV has also been isolated from thirteen species of this introductory birds' list and five have been shown to have viremia levels sufficient to infect competent mosquito vectors under experimental conditions (Table 4).

#### **List of amplifying birds**

Considering our hypotheses, a total of 87 species are likely to be responsible for WNV amplification in the Camargue (Table 3). The number of species is very similar in wet (n=51) and dry (n=53) areas. Potential amplifying species are mainly waterbirds (such as herons, waders, gulls and terns) and passerines in wet areas, whereas they are mostly small passerines, corvids and doves in dry areas (Table 2). Serological evidence of contact with WNV in the

Old World has been reported in 40 and 47 per cent of the amplifying species respectively in dry and wet areas (Table 2). In France, antibodies have been tested for and found in the following species: Mallard (*A. platyrhynchos*), Yellow-legged Gull (*L. cachinnans*), Common Magpie (*P. pica*), Tree Sparrow (*Passer montanus*) and House Sparrow (*P. domesticus*) (Table 2). Viremia levels high enough to experimentally infect competent mosquitoes have been observed in six species from this list and, according to the bibliography, WNV isolation has been performed in ten of these potential amplifying species (Table 4).

### **List of spreading birds**

Among the 289 species regularly seen in the Camargue, 18 potentially play a role in the spread of WNV from wet to dry areas at the end of summer (Table 3). Of those, 12 have already been found in the Old World with WNV antibodies (Table 2) and eight allowed WNV isolation or showed high viremia levels during experimental infection (Table 4). Birds of this list are herons (*Bubulcus ibis*, *Ardea cinerea*), gulls (*L. cachinnans*, *L. melanocephalus*, *L. ridibundus*), corvids (*P. pica*, *Corvus corone*, *C. monedula*), starlings (*Sturnus vulgaris*) and small passerine species (Table 2).

### **List of introductory and amplifying birds**

Among the 122 bird species likely to introduce WNV in the Camargue, 59 are also potential amplifying bird species and 24 are potential amplifying bird species in which antibodies have been found in the Old World (Table 2). Half of these species, possibly involved in both introduction and amplification of WNV in the Camargue, belong to the order Passeriformes. Other species are, with a few exceptions, waterbirds (Table 2).

### **List of introductory, amplifying and spreading birds**

Fifteen species, out of the 18 supposed to play a role in WNV spread from wet to dry areas in the Camargue, are also likely to be involved in the amplification of the virus and its introduction into the Camargue. These species are listed in Table 5.

## **DISCUSSION**

Bird species potentially involved in WNV introduction, amplification and spread respectively are numerous. This reveals the complexity of studying WNV ecology in bird populations. We purposely included species which are regularly observed but are present only in small numbers because we believe that diversity is a key element to take into account while studying bird-associated pathogens.

The fact antibodies were found in some species must be considered with caution because of cross-reaction possibilities with other Flaviviruses in serology (low specificity) (McLean et al. 2002), and because most studies are based on small size samples which do not allow the detection of low prevalence levels (low sensitivity). Furthermore, the presence of antibodies

in a blood sample only reveals that the corresponding bird has been in contact with the virus but it is not known how long ago and where this contact took place. Consequently, the presence of antibodies in a species does not necessarily indicate that this species is able to play a role in WNV introduction, amplification or spread. Conversely, the fact that viremia levels were observed and WNV isolation was made on some species can be regarded as a supplementary clue that these species might be involved in the WNV transmission cycle. But one must keep in mind that most other species have probably never been studied at all because studies are usually focused on the few species which are easily captured and handled.

### **West Nile virus introduction**

It is known from phylogenetic analysis of complete genome sequences that the strains isolated in the western Mediterranean basin (Morocco 1996, Italy 1998, France 2000, Morocco 2003) are closely related to other strains found in Africa (Kenya 1998) and eastern Europe (Romania 1996, Volgograd 1999 and 2000) (Charrel et al. 2003; Schuffenecker et al. 2005). This is in favor of the existence of viral gene flow in the Old World but, as very few strains have been isolated and totally sequenced, these data are not sufficient to establish how and when WNV circulation occurs.

Migratory birds are believed to be instrumental in the introduction of the virus in temperate areas of Eurasia (Hannoun et al. 1972; Hubalek and Halouzka 1999). The ability of competent arthropod vectors to get infected by WNV while feeding on a viremic bird was experimentally proven for some mosquito (Work et al. 1955; Turell et al. 2002; Reisen et al. 2005; Tiawsirisup et al. 2005) and tick species (Hutcheson et al. 2005). Consequently, migrating birds that sustain a high viremic titer might introduce WNV into new areas by contaminating blood-feeding arthropod vectors which could later transmit the infection to local birds. Surveys on bird ectoparasites have shown that ticks frequently infest a wide range of species, especially thrushes and other ground foraging birds (Hoogstraal et al. 1963; Ernek et al. 1972; Reed et al. 2003). Infected ticks carried by birds coming from an enzootic or epizootic area might drop after their blood meal and, after molting, become able to contaminate a new vertebrate host. Similarly, migrating birds with a high viremic titer might contaminate local mosquito species which, if they happen to be competent vector species, will elicit a local transmission cycle. Experimental infection studies suggest that the viremia level remains high in birds only for a short duration, usually 5-7 days (Komar et al. 2003; Reisen et al. 2005). So, in order to introduce WNV into the Camargue, an infected bird should be contaminated no more than seven days before its arrival in the Rhône delta.

However, one may suspect that the physiologic stress associated with migration could enhance the level and the duration of viremia and increase the probability of a bird coming from an area with WNV circulation to arrive viremic in the Camargue. Indeed, host-virus

interactions might be modified because of stress and the duration of viremia experimentally measured might be different for a free-living migrating individual.

Because of these uncertainties on how WNV can be introduced by birds, we purposely used broad selection criteria for introductory birds, taking into account all species coming from tropical Africa, northern Africa and eastern Europe (Table 1). Hence the very broad list of species (n=122) supposed to be able to bring WNV into the Camargue (Tables 2 and 3).

### **West Nile virus amplification**

The amplification of WNV is the result of a bird-mosquito-bird cycle. For this cycle to take place, amplifying birds need to share their habitat with competent ornithophilic mosquito vectors. The list of potentially amplifying bird species presented in Table 2 was obtained considering that all the bird species breeding in wet (respectively dry) areas of the Camargue are potential amplifying species. We supposed indeed that all these species are likely to be exposed to ornithophilic mosquitoes and, hence, to take part in the WNV amplification cycle. However, this hypothesis might not be restrictive enough.

In the Camargue, two strongly ornithophilic mosquito species, *i.e.* *Culex modestus* and *Culex pipiens*, are considered as good enzootic vector candidates involved in the WNV amplification cycle (Mouchet et al. 1970; Balenghien et al. 2006). Knowledge on these species might help identifying habitats where birds are more likely to get an infective mosquito bite and, as a consequence, are more likely to act as WNV amplifying hosts.

A recent study conducted in the Camargue area (Balenghien et al. 2006) revealed that, in the dry area, only *Cx. pipiens* mosquitoes are frequently found in bird-baited traps and that they are more numerous at the canopy than at the ground level. This might mean that only arboreal birds are likely to be amplifying hosts for WNV in dry areas and that species such as the Red-legged Partridge (*Alectoris rufa*), the Common Pheasant (*Phasianus colchicus*), the Skylark (*Alauda arvensis*), the Tawny Pipit (*Anthus campestris*) or the Yellow Wagtail (*Motacilla flava*) could maybe be removed from our list of likely amplifying birds.

In the wet part of the Camargue, *Cx. modestus*, a species closely related to rice fields and reed marshes, is believed to be a key vector in WNV epidemiological cycle (Mouchet et al. 1970). Bird species specific to the “sansouires” saltmarshes, such as the Skylark (*A. arvensis*), the Tawny Pipit (*A. campestris*), the Yellow Wagtail (*M. flava*) and the Spectacled Warbler (*Sylvia conspicillata*), are unlikely to be in contact with this poorly dispersive mosquito species and might be lesser candidates for WNV amplification in wet areas. Contrary to what was described in the dry area, *Cx. pipiens* in wet Camargue were found equally at ground and canopy levels whereas *Cx. modestus* were more numerous at ground level (Balenghien et al. 2006). This means that, in wet Camargue, the list of candidate WNV amplifying species remains very broad even if data on likely mosquito vector species are taken into account.

Potential amplifying bird species, and particularly those with a peridomestic habitat, can also be considered as possibly involved species in the emergence of the virus (*i.e.* transmission of the virus to susceptible hosts, namely humans and horses). It is interesting to note, for instance, that the House sparrow (*P. domesticus*), which belongs to both the amplifying and spreading bird lists, has previously been suspected to be a reservoir of WNV because it shows a high level of viremia during experimental infection (Work et al. 1955; Komar et al. 2003). It is also known for playing a role in the epidemiology of a closely related arbovirus called St. Louis encephalitis virus (McLean et al. 1983; Gruwell et al. 2000).

Supplementary field and laboratory investigations are necessary to reduce the list of potential amplifying species suggested at this stage of work. Blood meal analyses, for instance, could help to determine on which bird species WNV vector candidates most frequently feed (Apperson et al. 2004; Molaei et al. 2006). Combined with experimental infection studies, showing whether the identified species sustain viremia levels high enough to infect competent mosquitoes, these data should make it possible to reveal which bird species play a key role in WNV amplification cycle in the Camargue.

### **West Nile virus local spread**

WNV outbreaks in Europe present a patchy distribution and foci are most often located in close proximity to wetland areas (Hubalek and Halouzka 1999), probably because amplification by vectors and birds present in wet areas is necessary before the virus can be transmitted to sensitive hosts. Under this hypothesis, WNV epizootics may occur in dry areas only if the virus is carried from a close wet amplifying area.

Mosquito species able to cover a distance of several kilometers from their breeding sites could be responsible for WNV exportation. Whereas this moving away behavior is well-known for the mammophilic species *Aedes caspius*, strongly ornithophilic mosquito species supposed to be involved in WNV amplification cycle in the Camargue, *i.e.* *Cx. modestus* and *Cx. pipiens*, are poorly dispersive (Balenghien et al. 2006). Birds are consequently likely to be important actors of WNV spread from wet to dry neighboring zones.

We suggested a list of 18 species which could play a role in the spread of WNV from wet to dry areas at the end of summer (Table 2). It corresponds to bird species present in wet Camargue between the months of April and June and in dry Camargue between August and September. Among these species, three categories can be distinguished: (a) species presenting daily movements, both in spring and summer, between wet and dry areas (*e.g.* gulls, herons); (b) species which gather at the end of the breeding season and move in more or less numerous groups throughout wet and dry areas (*e.g.* martins, swallows, starlings, sparrows and corvids); (c) species found simultaneously in both wet and dry areas with no documented obvious movements (*e.g.* small passerines such as nightingales, warblers and wagtails). The first two groups are the most likely to be responsible for WNV transfer from wet to dry zones.

Some of these species simultaneously have the characteristics to introduce, amplify and spread WNV (Table 5). Alone, they might have been responsible for the emergence of WNV in dry areas in late summer 2000 and should perhaps be considered as key species in WNV ecology in the Camargue.

### **Indicator species**

The suggested bird lists might be helpful to define species that could be used as an indicator of WNV transmission. According to Gibbs et al. (2006), a reliable avian indicator species has (a) a widespread distribution, (b) a range including and allowing for detection of potentially important ecological variables, (c) a close association with humans, (d) an abundance and behavior that facilitates sampling, (e) a detectable antibody response following infection, and (f) an ability to survive WNV infection. We consider here that the species has also to be nonmigratory. In Table 2, 17 species are classified as potentially involved in WNV amplification both in wet and dry areas. Among them, only five are sedentary, namely the House Sparrow (*P. domesticus*), the Tree Sparrow (*P. montanus*), the Common Magpie (*P. pica*), the Carrion Crow (*C. corone*), and the Jackdaw (*C. monedula*). These five species can be considered as relevant indicator species of WNV circulation in the Camargue. However, as antibodies are likely to remain detectable in bird sera for more than a year (Kuno 2001; Gibbs et al. 2005), and as WNV circulation has already been detected several years in a row in the Camargue (Zeller et al. 2004), the presence of antibodies in the blood of adult birds will not necessarily reveal a recent circulation of the virus. Recapture and evidence of seroconversion would consequently be necessary to prove a recent transmission with certainty (Komar 2001). Particular attention could also be paid to young birds of the year but serological results should be considered with caution because of the possibility of maternal antibody transmission (Komar 2001; Reisen et al. 2005).

### **Epidemiological scenarios**

Both steps of WNV amplification and spread are present in the three suggested scenarios of WNV circulation in the Camargue (Figure 4). Conversely, data on virus introduction are relevant only for scenarios (a) and (b), *i.e.* introduction of the virus from Africa and eastern Europe respectively. Investigations on virus overwintering possibilities are necessary only for scenarios (b) and (c), *i.e.* introduction of the virus in autumn from eastern Europe and endemic virus circulation in the Camargue, respectively.

In order to provide evidence of WNV amplification and spread, field investigations should include serological studies on birds listed as indicator or potential amplifying species, in an attempt to show seroconversion or positive serology of yearlings. Dead birds of these species should be collected and tested for WNV by molecular biology methods. Host preference studies based on blood meal analysis (Kilpatrick et al. 2006; Molaei et al. 2006) of likely mosquito vector species should help to reduce this list of potential amplifying bird species. A

spatio-temporal ecological approach compiling the distribution of bird and vector species might also prove useful to improve the suggested list.

The scenario (a) (Figure 4a), which is based on the introduction of WNV by birds migrating from Africa in spring, is highly probable because WNV is believed to be widespread on the African continent (Murgue et al. 2002) and WNV isolation has already been performed from birds during their migration from Africa to Eurasia (Watson et al. 1969). Better knowledge on the location of WNV foci in Africa as well as detailed data on migratory species flyways would help assess this risk. Further studies on bird migration speed and duration of viremia in birds living in natural conditions would create an understanding on how birds infected at wintering or stopover places in Africa can still infect mosquitoes when they reach the Camargue. The possible role in WNV introduction of ectoparasites, such as hard ticks, should be experimentally assessed for species present in the Old World and stages most frequently found on birds, namely larvae and nymphs.

Scenario (b) (Figure 4b) supposes that WNV is introduced during the autumn migration by birds coming from eastern Europe. Indeed, investigations in recent years revealed WNV circulation in several countries located in eastern or central Europe (Juricova et al. 1998; Hubalek et al. 2000; Campbell et al. 2001; Lvov et al. 2004; Bakonyi et al. 2006). In Israel, isolation was performed in 1998 from white storks (*Ciconia ciconia*) that had probably hatched and become infected in central Europe (Malkinson et al. 2002; Bakonyi et al. 2006). The introduction of WNV from eastern Europe into the Camargue is consequently likely in autumn or late summer, when migrating birds leave their breeding sites. However, even if infected birds arrive in early August, it is unlikely that the virus would have time to be amplified within the Camargue bird population and to elicit an outbreak in horses before the cease of mosquitoes activity in late autumn. Conversely, if the virus were able to survive during winter, it might then be amplified the next year and transmitted to sensitive hosts.

If WNV proves able to overwinter in the Camargue, then scenario (c) (Figure 4c), which hypothesizes that WNV persists there in an endemic foci, also becomes plausible. Under the hypothesis that WNV transmission is only the result of a bird-mosquito-bird cycle, its circulation should be interrupted in winter when mosquito vectors enter diapause. For the cycle to start again the following spring, WNV has to be kept in conditions which allow it to be still virulent, either in a vertebrate or an arthropod host. Recurrent viremia and antibody response associated with arboviruses have been observed occasionally in various vertebrate species, including birds, revealing that vertebrate hosts could play a role not restricted to transient amplification of the virus (Kuno 2001; Reisen et al. 2006). Long term investigations are essential to have more comprehensive knowledge on the interactions between arboviruses and birds.

Until now, efforts have mostly been put in showing that WNV is able to overwinter in arthropod vectors, *i.e.* mosquitoes (Nasci et al. 2001; Farajollahi et al. 2005) or ticks (Anderson et al. 2003; Lawrie et al. 2004). In the Camargue, during the 1960s, investigations showed for instance that female *Cx. modestus* mosquitoes spend the winter in reed beds (Mouchet et al. 1970) and it was hypothesized that they might allow the virus to overwinter (Joubert and Oudar 1970). Such captures of adult females would be relevant to repeat in order to know if WNV can indeed be isolated from mosquito pools during winter.

### **Perspectives**

This comprehensive approach has allowed us to classify the about 300 bird species regularly observed in the Camargue without any *a priori* on potentially involved species. These lists will prove useful to determine target species on which further studies on WNV ecology in birds could be focused. Hopefully, these complementary investigations will enable the size of the bird lists suggested at this stage of work to be reduced and provide a better understanding of ecological factors involved in WNV outbreaks.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank the ornithologists of the Station Biologique de la Tour du Valat who have gathered for decades highly valuable data on birds of the Camargue. We thank the CNES (French National Centre for Spatial Studies) and the INRA (French National Institute for Research in Agronomy) who financially supported this work as part of the Spatial Surveillance of Epidemics (S2E) Project. We thank the IFEN (French National Institute for the Environment) who provided us with CORINE Land Cover data. We are grateful to C. Farmer from the College of Veterinary Medicine (Lyon) who kindly accepted to critically read our manuscript. Many thanks also to T. Balenghien (College of Veterinary Medicine, Lyon) for fruitful discussions.



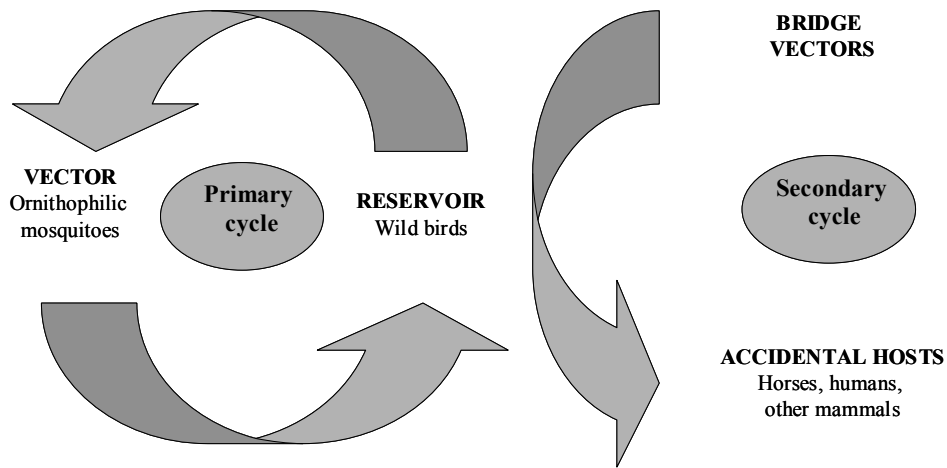
## REFERENCES

- Anderson, JF, Main, AJ, Andreadis, TG, Wikel, SK et al. Transstadial transfer of West Nile virus by three species of ixodid ticks (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 2003; 40: 528-533.
- Apperson, CS, Hassan, HK, Harrison, BA, Savage, HM et al. Host feeding patterns of established and potential mosquito vectors of West Nile virus in the eastern United States. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2004; 4: 71-82.
- Bakonyi, T, Ivanics, E, Erdélyi, K, Ursu, K et al. Lineage 1 and 2 Strains of Encephalitic West Nile Virus, Central Europe. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 618-623.
- Balenghien, T, Fouque, F, Sabatier, P, Bicout, DJ. Horse, bird and human-seeking behavior and seasonal abundance of mosquitoes in a West Nile focus of southern France. *J Med Entomol* 2006; *in press*.
- Banet-Noach, C, Gantz, AY, Lublin, A, Malkinson, M. A twelve-month study of West Nile virus antibodies in a resident and a migrant species of Kestrels in Israel. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2004; 4: 15-22.
- Bicout, D, Leblond, A, Heng, MA, Durand, B et al. Analysis of seroprevalence in horses in an endemic area of West Nile disease, Camargue, France. In: X<sup>th</sup> Congress of the International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics, Vina del Mar, Chile, 2003.
- Blondel, J, Isenmann, P. Guide des oiseaux de Camargue. Neuchâtel-Paris: Delachaux & Niestlé; 1981.
- Buckley, A, Dawson, A, Moss, SR, Hinsley, SA et al. Serological evidence of West Nile virus, Usutu virus and Sindbis virus infection of birds in the UK. *J Gen Virol* 2003; 84: 2807-2817.
- Campbell, GL, Ceianu, CS, Savage, HM. Epidemic West Nile encephalitis in Romania: waiting for history to repeat itself. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 951: 94-101.
- CDC. Outbreak of West Nile-like viral encephalitis - New York, 1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1999; 48: 845-849.
- Charrel, RN, Brault, AC, Gallian, P, Lemasson, JJ et al. Evolutionary relationship between Old World West Nile virus strains. Evidence for viral gene flow between Africa, the Middle East, and Europe. *Virology* 2003; 315: 381-388.
- Curry-Lindhal, K. Bird migration in Africa. London: Academic Press; 1981.
- Dauphin, G, Zientara, S, Zeller, H, Murgue, B. West Nile: worldwide current situation in animals and humans. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004; 27: 343-355.
- Del Giudice, P, Schuffenecker, I, Vandebos, F, Counillon, E et al. Human West Nile virus, France. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 1885-1886.
- Dubois, PJ, Le marechal, P, Oliosio, G, Yesou, P. Inventaire des oiseaux de France. Avifaune de la France métropolitaine. Paris: Nathan/HER; 2000.
- Durand, B, Chevalier, V, Pouillot, R, Labie, J et al. West Nile virus outbreak in horses, southern France, 2000: results of a serosurvey. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 777-782.
- Ernek, E, Nosek, J, Kozuch, O. Ticks as vectors of arboviruses in birds in Czechoslovakia. *Wiad Parazytol* 1972; 18: 571-576.
- Farajollahi, A, Crans, WJ, Bryant, P, Wolf, B et al. Detection of West Nile viral RNA from an overwintering pool of *Culex pipens pipiens* (Diptera: Culicidae) in New Jersey, 2003. *J Med Entomol* 2005; 42: 490-494.
- Gibbs, SE, Allison, AB, Yabsley, MJ, Mead, DG et al. West Nile virus antibodies in avian species of Georgia, USA: 2000-2004. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2006; 6: 57-72.
- Gibbs, SE, Hoffman, DM, Stark, LM, Marlenee, NL et al. Persistence of antibodies to West Nile virus in naturally infected rock pigeons (*Columba livia*). *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12: 665-667.

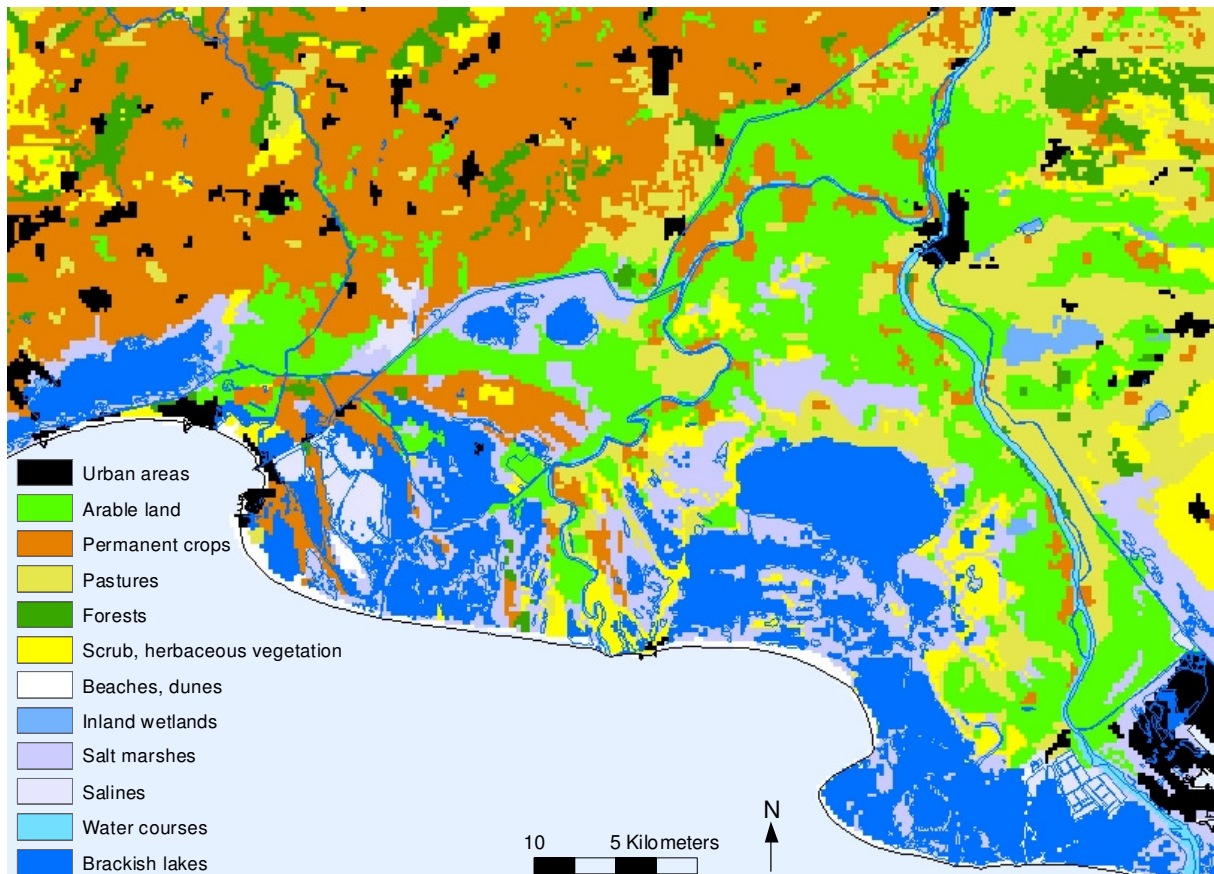
- Gruwell, JA, Fogarty, CL, Bennett, SG, Challet, GL et al. Role of peridomestic birds in the transmission of St. Louis encephalitis virus in southern California. *J Wildl Dis* 2000; 36: 13-34.
- Hagemeyer, W. The EBCC atlas of European breeding birds. London: Poyser; 1997.
- Hannoun, C, Corniou, B, Mouchet, J. Role of migrating birds in arbovirus transfer between Africa and Europe. In: Cherepanov, A, ed. *Transcontinental connections of migratory birds and their role in the distribution of arboviruses*. Novosibirsk: Nauka; 1972: 167-172.
- Hars, J, Augé, P, Chavernac, D, Balença, G et al. Surveillance de l'infection de l'avifaune camarguaise par le virus West Nile. *Faune sauvage* 2004; 261: 54-58.
- Hars, J, Augé, P, Pradel, J, Mortamais, M et al. Surveillance network of West Nile virus in the avifauna in the South of France. In: VIII<sup>th</sup> European Association of Avian Veterinarians Conference, Arles, France, 2005.
- Hoogstraal, H, Kaiser, MN, Traylor, MA, Guindy, E et al. Ticks (Ixodidae) on birds migrating from Europe and Asia to Africa 1959-61. *Bull World Health Organ* 1963; 28: 235-262.
- Hubalek, Z. European experience with the West Nile virus ecology and epidemiology: could it be relevant for the New World? *Viral Immunol* 2000; 13: 415-426.
- Hubalek, Z, Halouzka, J. West Nile fever - a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 643-650.
- Hubalek, Z, Savage, HM, Halouzka, J, Juricova, Z et al. West Nile virus investigations in South Moravia, Czechland. *Viral Immunol* 2000; 13: 427-433.
- Hutcheson, HJ, Gorham, CH, Machain-Williams, C, Lirono-Pino, MA et al. Experimental transmission of West Nile virus (Flaviviridae: Flavivirus) by *Carios capensis* ticks from North America. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2005; 5: 293-295.
- Isenmann, P. The birds of Camargue. Brunoy: Société d'Etudes Ornithologiques, Muséum d'Histoire Naturelle; 1993.
- Jamgaonkar, AV, Yergolkar, PN, Geevarghese, G, Joshi, GD et al. Serological evidence for Japanese encephalitis virus and West Nile virus infections in water frequenting and terrestrial wild birds in Kolar District, Karnataka State, India. A retrospective study. *Acta Virol* 2003; 47: 185-188.
- Joubert, L, Oudar, J. Les zoonoses arbovirales. Leur présence en France. II La méningo-encéphalomyélite équine West Nile du Midi méditerranéen français. *Revue Méd Vét* 1970; 121: 221-246.
- Juricova, Z, Hubalek, Z, Halouzka, J, Hudec, K et al. Results of arbovirological examination of birds of the family Hirundinidae in Czechoslovakia. *Folia Parasitol (Praha)* 1989; 36: 379-383.
- Juricova, Z, Hubalek, Z, Halouzka, J, Pellantova, J et al. Haemagglutination-inhibiting antibodies against arboviruses of the families Togaviridae and Bunyaviridae in birds caught in southern Moravia, Czechoslovakia. *Folia Parasitol (Praha)* 1987; 34: 281-284.
- Juricova, Z, Pinowski, J, Literak, I, Hahm, KH et al. Antibodies to alphavirus, flavivirus, and bunyavirus arboviruses in house sparrows (*Passer domesticus*) and tree sparrows (*P. montanus*) in Poland. *Avian Dis* 1998; 42: 182-185.
- Kayser, Y, Girard, C, Massez, G, Chérain, Y et al. Compte-rendu ornithologique camarguais pour les années 1995-2000. *Revue d'Ecologie (Terre & Vie)* 2003; 58: 5-76.
- Kilpatrick, AM, Kramer, LD, Jones, MJ, Marra, PP et al. West Nile virus epidemics in North America are driven by shifts in mosquito feeding behavior. *PLoS Biol* 2006; 4: e82.
- Komar, N. West Nile viral encephalitis. *Rev Sci Tech* 2000; 19: 166-176.
- Komar, N. West Nile virus surveillance using sentinel birds. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 951: 58-73.
- Komar, N, Langevin, S, Hinten, S, Nemeth, N et al. Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 311-322.

- Kuno, G. Persistence of arboviruses and antiviral antibodies in vertebrate hosts: its occurrence and impacts. *Rev Med Virol* 2001; 11: 165-190.
- Lawrie, CH, N.Y., U, E.A., G, Nuttal, PA. Ixodid and Argasid tick species and West Nile virus. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 653-657.
- Lvov, DK, Butenko, AM, Gromashevskii, VL, Kovtunov, AI et al. West Nile and other zoonotic viruses in Russia: examples of emerging-reemerging situations. *Arch Virol (suppl)* 2004; 18: 85-96.
- Malkinson, M, Banet, C. The role of birds in the ecology of West Nile virus in Europe and Africa. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 267: 309-322.
- Malkinson, M, Banet, C, Weisman, Y, Pokamunski, S et al. Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 392-397.
- McLean, RG, Mullenix, J, Kerschner, J, Hamm, J. The house sparrow (*Passer domesticus*) as a sentinel for St. Louis encephalitis virus. *Am J Trop Med Hyg* 1983; 32: 1120-1129.
- McLean, RG, Ubico, SR, Bourne, D, Komar, N. West Nile virus in livestock and wildlife. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 267: 271-308.
- McLean, RG, Ubico, SR, Docherty, DE, Hansen, WR et al. West Nile virus transmission and ecology in birds. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 951: 54-57.
- Molaei, G, Andreadis, TG, Armstrong, PM, Anderson, JF et al. Host feeding patterns of *Culex* mosquitoes and West Nile virus transmission, Northeastern United States. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 468-474.
- Mouchet, J, Rageau, J, Laumond, C, Hannoun, C et al. Epidemiologie du virus West Nile : étude d'un foyer en Camargue. V. Le vecteur : *Culex modestus* Ficalbi Diptera; Culicidae. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 1970; 118: 839-355.
- Murgue, B, Murri, S, Zientara, S, Durand, B et al. West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 692-696.
- Murgue, B, Zeller, H, Deubel, V. The ecology and epidemiology of West Nile virus in Africa, Europe and Asia. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 267: 195-221.
- Nasci, RS, Savage, HM, White, DJ, Miller, JR et al. West Nile virus in overwintering *Culex* mosquitoes, New York City, 2000. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 742-744.
- Rappole, JH, Derrickson, SR, Hubalek, Z. Migratory birds and spread of West Nile virus in the Western Hemisphere. *Emerg Infect Dis* 2000; 6: 319-328.
- Rappole, JH, Hubalek, Z. Migratory birds and West Nile virus. *J Appl Microbiol* 2003; 94 Suppl: 47S-58S.
- Reed, KD, Meece, JK, Henkel, JS, Shukla, SK. Birds, migration and emerging zoonoses: West Nile virus, lyme disease, influenza A and enteropathogens. *Clin Med Res* 2003; 1: 5-12.
- Reisen, WK, Fang, Y, Lothrop, HD, Martinez, VM et al. Overwintering of West Nile virus in Southern California. *J Med Entomol* 2006; 43: 344-355.
- Reisen, WK, Fang, Y, Martinez, VM. Avian host and mosquito (Diptera: Culicidae) vector competence determine the efficiency of West Nile and St. Louis encephalitis virus transmission. *J Med Entomol* 2005; 42: 367-375.
- Reisen, WK, Wheeler, SS, Yamamoto, S, Fang, Y et al. Nesting Ardeid colonies are not a focus of elevated West Nile virus activity in southern California. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2005; 5: 258-266.
- Rollin, PE, Rollin, D, Martin, P, Baylet, R et al. Résultats d'enquêtes séroépidémiologiques récentes sur les arboviroses en Camargue: populations humaines, équine, bovine et aviaires. *Médecine et maladies infectieuses* 1982; 12: 77-80.

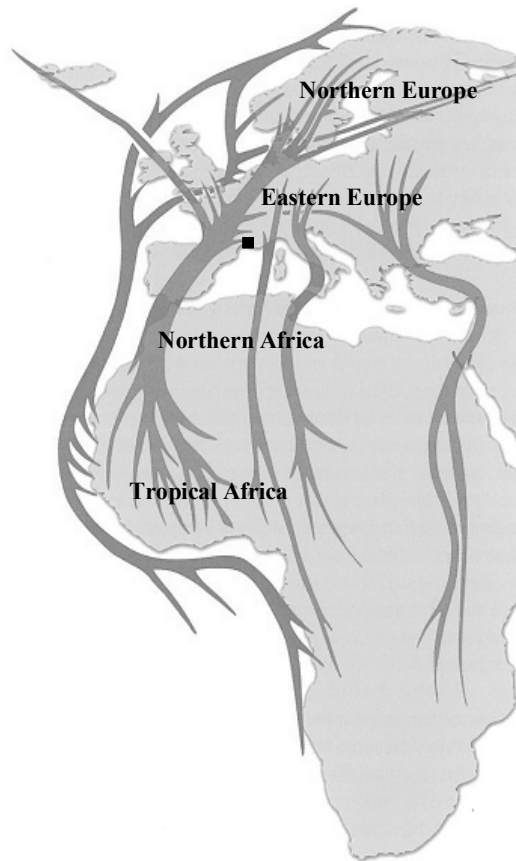
- Schuffenecker, I, Peyrefitte, CN, el Harrak, M, Murri, S et al. West Nile virus in Morocco, 2003. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 306-309.
- Smithburn, KC, Hughes, TP, Burke, AW, Paul, JH. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am J Trop Med Hyg* 1937; 20: 471-472.
- Taylor, RM, Work, TH, Hurlbut, HS, Rizk, F. A study of the ecology of West Nile virus in Egypt. *Am J Trop Med Hyg* 1956; 5: 579-620.
- Tiawsirisup, S, Platt, KB, Evans, RB, Rowley, WA. A comparison of West Nile Virus transmission by *Ochlerotatus trivittatus* (COQ.), *Culex pipiens* (L.), and *Aedes albopictus* (Skuse). *Vector Borne Zoonotic Dis* 2005; 5: 40-47.
- Turell, MJ, Sardelis, MR, O'Guinn, ML, Dohm, DJ. Potential vectors of West Nile virus in North America. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 267: 241-252.
- Watson, GE, Shope, RE, Kaiser, MN. An ectoparasite and virus survey of migratory birds in the Eastern Mediterranean. In: *Transcontinental connections of migratory birds and their role in the distribution of arboviruses. V<sup>th</sup> Symposium of the study of role of migrating birds in distribution of arboviruses, Novosibirsk, 1969.*
- Weber, K, Hoffmann, L. *Camargue, the soul of a wilderness.* Berne: Kümmerly & Frey Geographical publishers; 1968.
- Work, TH, Hurlbut, HS, Taylor, RM. Indigenous wild birds of the Nile Delta as potential West Nile virus circulating reservoirs. *Am J Trop Med Hyg* 1955; 4: 872-888.
- Zeller, H, Zientara, S, Hars, J, Languille, J et al. West Nile outbreak in horses in Southern France: September 2004. *Eurosurveillance Weekly* 2004; 8.



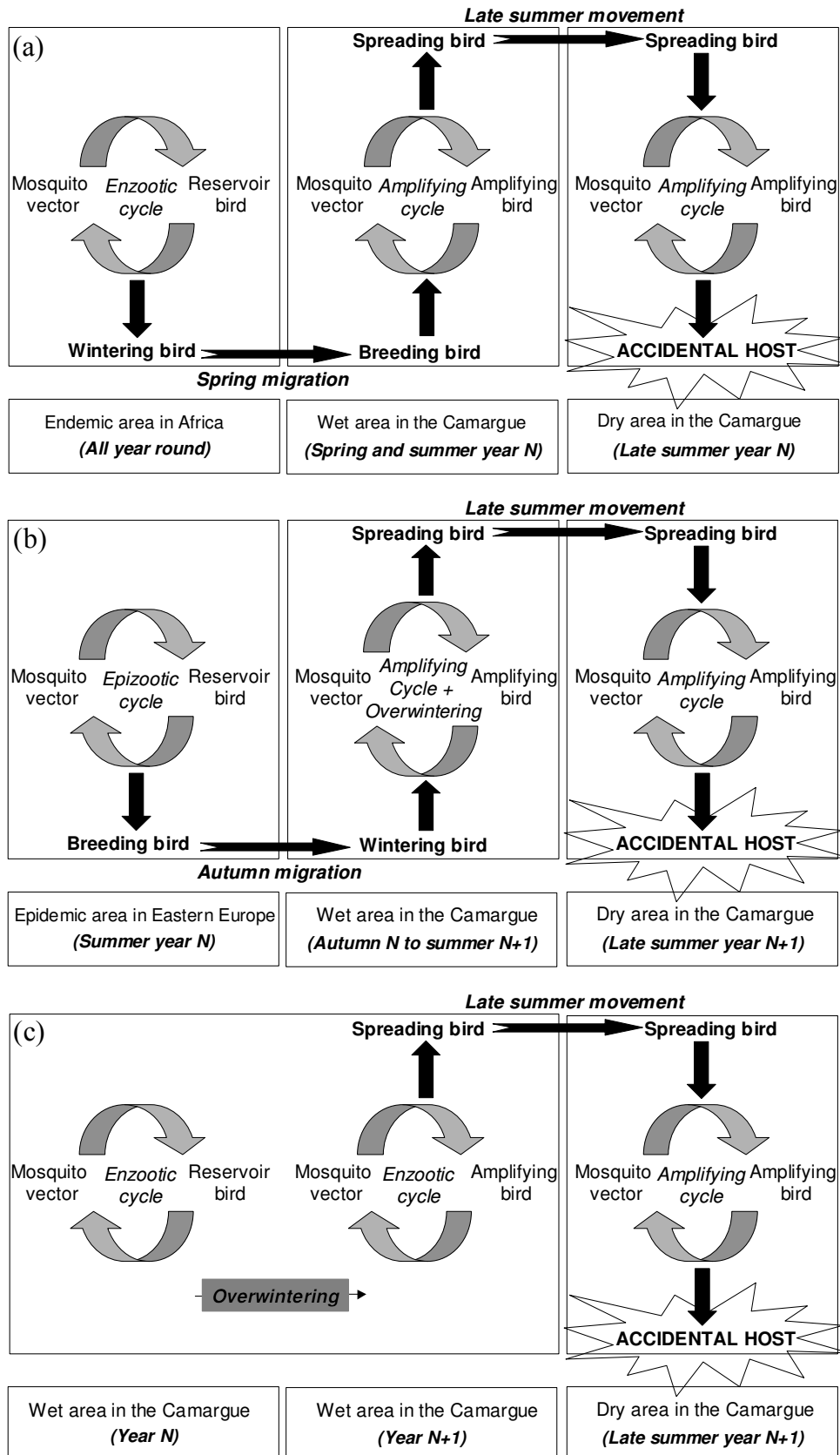
**Figure 1:** West Nile virus transmission cycle.



**Figure 2:** Map showing the main habitats of the Camargue *sensu lato*.



**Figure 3:** Map of the main migratory flyways of birds between Eurasia and Africa (the black square indicates where the Camargue is located).



**Figure 4:** Potential scenarios of West Nile virus (WNV) circulation in the Camargue: (a) WNV introduced by birds migrating from endemic areas in Africa; (b) WNV introduced by birds migrating from epidemic areas in eastern Europe; (c) WNV endemic in wet areas of the Camargue.

**Table 1:** Selection criteria of bird species for the introduction, amplification and spread of West Nile virus in the Camargue.

Bird classes	Migratory status	Wintering (W) or Breeding (B) area	Period of presence in the Camargue	Minimum number	Biotores used
<b>Introductory birds</b>	MB, PV	W: Tropical Africa	March and/or April	100	(1) (2) wet areas
	MB, PV	W: North Africa	March and/or April	100	(1) (2) wet areas
	WV, PV	B: Eastern Europe	August	100	(1) (2) wet areas
	WV, PV	B: Eastern Europe	September and/or October	100	(1) (2) wet areas
<b>Amplifying birds</b>	CB, MB, RB	B: Camargue <i>s.l.</i>	April to August	100	(1) (2) wet areas
	CB, MB, RB	B: Camargue <i>s.l.</i>	June to August	100	(3) (4) (5) dry areas
<b>Spreading birds</b>	CB, MB, RB	B: Camargue <i>s.l.</i>	April to June	100	(1) (2) wet areas
			and August to September	100	(3) (4) (5) dry areas

CB = Casual Breeder	(1) sansouires, lagoons, brackish lakes, beaches, dunes
MB = Migrant Breeder	(2) freshwater marshes, flooded rice fields, reed beds
RB = Resident Breeder	(3) dry cultivated areas, dry grass lands
PV = Passage Visitor	(4) towns, human settlements
WN = Winter Visitor	(5) forests, bushes

**Table 3:** Number of introductory, amplifying and spreading bird species in the Camargue.

Introduction		Amplification		Spread
Introduction from Africa	Introduction from Eastern Europe	Amplification in wet areas	Amplification in dry areas	From dry to wet areas
111	87	51	53	
	122		87	18



**Table 2:** Candidate species respectively for the introduction (from Africa/Eastern Europe), amplification and spread of West Nile virus in the Camargue. For each species, it is also mentioned whether antibodies against West Nile virus have been found in the Old World. Species the most numerous in the Camargue between spring and autumn are indicated in bold characters.

Family	Species (English name)	Species (Latin name)	WN antibodies in literature ("+" if in the Old World, "F+" if in France)	Introduction from Sub-Saharan Africa	Introduction from North Africa	Introduction from Eastern Europe in September or October	Introduction from Eastern Europe in early August	Amplification in wet areas	Amplification in dry areas	Spreading from wet to dry areas
Podicipedidae	Little Grebe	<i>Tachybaptus ruficollis</i>			+	+		+		
Podicipedidae	Great crested Grebe	<i>Podiceps cristatus</i>	+		+	+		+		
Podicipedidae	Black-necked Grebe	<i>Podiceps nigricollis</i>	+		+		+			
Phalacrocoracidae	Comorant	<i>Phalacrocorax carbo</i>	+		+	+				
Ardeidae	Night Heron	<i>Nycticorax nycticorax</i>	+	+		+	+	+		
<b>Ardeidae</b>	<b>Cattle Egret</b>	<b><i>Bubulcus ibis</i></b>	+		+			+	+	+
<b>Ardeidae</b>	<b>Little Egret</b>	<b><i>Egretta garzetta</i></b>	+	+	+			+		
Ardeidae	Great White Egret	<i>Egretta alba</i>			+	+				
Ardeidae	Grey Heron	<i>Ardea cinerea</i>	+	+		+	+	+	+	+
Ardeidae	Purple Heron	<i>Ardea purpurea</i>	+	+		+	+	+		
<b>Phenicopteridae</b>	<b>Greater Flamingo</b>	<b><i>Phoenicopterus ruber</i></b>		+	+			+		
Anatidae	Mute Swan	<i>Cygnus olor</i>				+				
Anatidae	Greylag Goose	<i>Anser anser</i>	+			+				
Anatidae	Common Shelduck	<i>Tadorna tadorna</i>			+	+		+		
Anatidae	Eurasian Wigeon	<i>Anas penelope</i>	+	+	+	+				
Anatidae	Gadwall	<i>Anas strepera</i>			+	+				
Anatidae	Common Teal	<i>Anas crecca</i>		+	+	+	+			
<b>Anatidae</b>	<b>Mallard</b>	<b><i>Anas platyrhynchos</i></b>	+	+	+	+	+	+		
Anatidae	Northern Pintail	<i>Anas acuta</i>		+	+	+				
Anatidae	Garganey	<i>Anas querquedula</i>	+		+	+	+			
Anatidae	Shoveler	<i>Anas clypeata</i>		+	+	+	+			
Anatidae	Red-Crested Pochard	<i>Netta rufina</i>				+	+			
Anatidae	Common Pochard	<i>Aythya ferina</i>			+	+				
Anatidae	Tufted Duck	<i>Aythya fuligula</i>			+					
Accipitridae	Honey Buzzard	<i>Pernis apivorus</i>		+						
Accipitridae	Black Kite	<i>Milvus migrans</i>	+	+		+	+			
Accipitridae	Red Kite	<i>Milvus milvus</i>				+				
Accipitridae	Marsh Harrier	<i>Circus aeruginosus</i>			+	+				
Accipitridae	Hen Harrier	<i>Circus cyaneus</i>			+	+				
Accipitridae	Common Buzzard	<i>Buteo buteo</i>	+		+	+				
Falconidae	Common Kestrel	<i>Falco tinnunculus</i>	+					+	+	
Falconidae	Red-footed Falcon	<i>Falco tinnunculus</i>	+	+						
Falconidae	Merlin	<i>Falco columbarius</i>			+					
Falconidae	Hobby	<i>Falco subbuteo</i>				+	+			
Phasianidae	Red-legged Partridge	<i>Alectoris rufa</i>							+	
Phasianidae	Common Pheasant	<i>Phasianus colchicus</i>							+	
Rallidae	Water Rail	<i>Rallus aquaticus</i>			+	+		+		
<b>Rallidae</b>	<b>Moorhen</b>	<b><i>Gallinula chloropus</i></b>	+		+	+		+		
<b>Rallidae</b>	<b>Common Coot</b>	<b><i>Fulica atra</i></b>	+		+	+		+		
Recurvirostridae	Black-winged Stilt	<i>Himantopus himantopus</i>	+	+	+			+		
Recurvirostridae	Pied Avocet	<i>Recurvirostra avosetta</i>	+	+	+			+		
Charadriidae	Little ringed Plover	<i>Charadrius dubius</i>				+				
Charadriidae	Great ringed Plover	<i>Charadrius hiaticula</i>		+	+					
Charadriidae	Kentish Plover	<i>Charadrius alexandrinus</i>	+	+	+	+	+	+		
Charadriidae	Golden Plover	<i>Pluvialis apricaria</i>			+					
Charadriidae	Grey Plover	<i>Pluvialis squatarola</i>		+	+			+		
Charadriidae	Lapwing	<i>Vanellus vanellus</i>	+	+	+	+				
Scolopacidae	Black-tailed Godwit	<i>Limosa limosa</i>		+	+	+	+			
Scolopacidae	Curlew Sandpiper	<i>Calidris ferruginea</i>	+	+	+					
Scolopacidae	Little Stint	<i>Calidris minuta</i>		+	+					
Scolopacidae	Sanderling	<i>Calidris alba</i>		+	+			+		
Scolopacidae	Dunlin	<i>Calidris alpina</i>		+	+			+		
Scolopacidae	Common Snipe	<i>Gallinago gallinago</i>	+		+	+				
Scolopacidae	Jack Snipe	<i>Lymnocyrtus minimus</i>		+	+					
Scolopacidae	Greenshank	<i>Tringa nebularia</i>		+	+					
Scolopacidae	Spotted Redshank	<i>Tringa erythropus</i>		+	+					
Scolopacidae	Green Sandpiper	<i>Tringa ochropus</i>		+	+					
Scolopacidae	Common Redshank	<i>Tringa totanus</i>		+	+	+	+	+		
Scolopacidae	Common Sandpiper	<i>Actitis hypoleucos</i>				+	+			

Family	Species (English name)	Species (Latin name)	WN antibodies in literature ("+" if in the Old World, "F+" if in France)	Introduction from Sub- Saharan Africa	Introduction from North Africa	Introduction from Eastern Europe in September or October	Introduction from Eastern Europe in early August	Amplificati on in wet areas	Amplificati on in dry areas	Spreading from wet to dry areas
Scolopacidae	Wood Sandpiper	<i>Tringa glareola</i>		+	+					
Scolopacidae	Ruff	<i>Philomachus pugnax</i>	+ (*)	+		+	+			
Scolopacidae	Curlew	<i>Numenius arquata</i>		+	+	+				
<b>Laridae</b>	<b>Yellow-legged Gull</b>	<b><i>Larus cachinnans</i></b>	+ (*) F+ (**)		+	+	+	+	+	+
Laridae	Slender-billed Gull	<i>Larus genei</i>		+	+			+		
Laridae	Mediterranean Gull	<i>Larus melanocephalus</i>		+	+	+	+	+		+
Laridae	Little Gull	<i>Larus minutus</i>	+ (*)	+	+	+	+			
<b>Laridae</b>	<b>Black-headed Gull</b>	<b><i>Larus ridibundus</i></b>	+ (†)	+	+	+	+	+	+	+
Sternidae	Common Tern	<i>Sterna hirundo</i>	+ (*, †)	+		+	+	+		
Sternidae	Little Tern	<i>Sterna albifrons</i>		+		+	+	+		
Sternidae	Gull-billed Tern	<i>Gelochelidon nilotica</i>		+		+	+	+		
Sternidae	Sandwich Tern	<i>Sterna sandvicensis</i>		+	+	+	+	+		
Sternidae	Black Tern	<i>Chlidonias nigra</i>	+ (*)	+		+	+			
Sternidae	Whiskered Tern	<i>Chlidonias hybridus</i>		+		+	+			
Columbidae	Collared Dove	<i>Streptopelia decaocto</i>	+ (*)						+	
Columbidae	Turtle Dove	<i>Streptopelia turtur</i>	+ (*, †)	+		+	+		+	
Columbidae	Wood Pigeon	<i>Columba palumbus</i>							+	
Columbidae	Rock Dove (Feral Pigeon)	<i>Columba livia</i>	+ (*, †)						+	
Cuculidae	Common Cuckoo	<i>Cuculus canorus</i>		+		+	+	+	+	
<b>Apodidae</b>	<b>Common Swift</b>	<b><i>Apus apus</i></b>		+		+	+	+	+	+
Apodidae	Alpine Swift	<i>Apus melba</i>		+					+	
Alcedinidae	European Kingfisher	<i>Alcedo atthis</i>				+				
Meropidae	European Bee-eater	<i>Merops apiaster</i>		+		+	+	+		
Upupidae	Hoopoe	<i>Upupa epops</i>	+ (§)	+					+	
Picidae	Green Woodpecker	<i>Picus viridis</i>	+ (††)						+	
Picidae	Greater Spotted Woodpecker	<i>Dendrocopos major</i>							+	
Alaudidae	Skylark	<i>Alauda arvensis</i>			+	+		+	+	
Hirundinidae	Sand Martin	<i>Riparia riparia</i>	+ (†††)	+		+	+	+		
<b>Hirundinidae</b>	<b>Barn Swallow</b>	<b><i>Hirundo rustica</i></b>	+ (††)	+		+	+	+	+	+
Hirundinidae	House Martin	<i>Delichon urbica</i>	+ (†††, ††)	+		+	+	+	+	+
Motacillidae	Water Pipit	<i>Anthus spinoletta</i>				+				
Motacillidae	Tawny Pipit	<i>Anthus campestris</i>				+	+	+	+	
Motacillidae	Meadow Pipit	<i>Anthus pratensis</i>	+ (‡‡)		+	+				
Motacillidae	Tree Pipit	<i>Anthus trivialis</i>		+		+	+			
Motacillidae	Yellow Wagtail	<i>Motacilla flava</i>		+	+	+	+	+	+	+
Motacillidae	Pied Wagtail	<i>Motacilla alba</i>	+ (†)	+	+	+				
Turdidae	Northern Wheatear	<i>Oenanthe oenanthe</i>		+		+	+			
Turdidae	Stonechat	<i>Saxicola torquata</i>		+	+	+				
<b>Turdidae</b>	<b>Black Redstart</b>	<b><i>Phoenicurus ochruros</i></b>		+	+				+	
Turdidae	Common Redstart	<i>Phoenicurus phoenicurus</i>	+ (††)	+	+	+	+			
<b>Turdidae</b>	<b>Eurasian Robin</b>	<b><i>Erithacus rubecula</i></b>	+ (*, †)						+	
<b>Turdidae</b>	<b>Common Nightingale</b>	<b><i>Luscinia megarhynchos</i></b>		+		+	+	+	+	+
Turdidae	Blue Rock Thrush	<i>Monticola solitarius</i>							+	
Turdidae	Bluethroat	<i>Luscinia svecica</i>		+	+	+				
Sylviidae	Great Reed Warbler	<i>Acrocephalus arundinaceus</i>		+		+	+	+		
<b>Sylviidae</b>	<b>Reed Warbler</b>	<b><i>Acrocephalus scirpaceus</i></b>	+ (†, ***, ‡‡)	+		+	+	+		
Sylviidae	Chiffchaff	<i>Phylloscopus collybita</i>		+	+	+	+			
Sylviidae	Wood Warbler	<i>Phylloscopus sibilatrix</i>		+		+	+			
Sylviidae	Willow Warbler	<i>Phylloscopus trochilus</i>		+		+	+			
Sylviidae	Bonelli's Warbler	<i>Phylloscopus bonelli</i>		+					+	
Sylviidae	Sedge Warbler	<i>Acrocephalus schoenobaenus</i>	+ (†, ***)			+				
Sylviidae	Moustached Warbler	<i>Acrocephalus melanopogon</i>						+		
Sylviidae	Grasshopper Warbler	<i>Locustella naevia</i>		+	+	+	+			
Sylviidae	Melodious Warbler	<i>Hippolais polyglotta</i>		+					+	+
<b>Sylviidae</b>	<b>Icterine Warbler</b>	<b><i>Hippolais icterina</i></b>		+		+	+			
Sylviidae	Dartford Warbler	<i>Sylvia undata</i>							+	

Family	Species (English name)	Species (Latin name)	WN antibodies in literature ("+" if in the Old World, "F+" if in France)	Introduction from Sub-Saharan Africa	Introduction from North Africa	Introduction from Eastern Europe in September or October	Introduction from Eastern Europe in early August	Amplificati on in wet areas	Amplificati on in dry areas	Spreading from wet to dry areas
Sylviidae	Subalpine Warbler	<i>Sylvia cantillans</i>		+					+	
Sylviidae	Orphean Warbler	<i>Sylvia hortensis</i>		+						
Sylviidae	<b>Sardinian Warbler</b>	<i>Sylvia melanocephala</i>							+	
Sylviidae	Whitethroat	<i>Sylvia communis</i>		+						
Sylviidae	Garden Warbler	<i>Sylvia borin</i>	+ (††)	+		+	+			
Sylviidae	<b>Blackcap</b>	<i>Sylvia atricapilla</i>	+ (‡‡)	+		+	+		+	+
Sylviidae	Spectacled Warbler	<i>Sylvia conspicillata</i>			+			+		
Sylviidae	Fan-tailed Warbler	<i>Cisticola juncidis</i>			+			+		
Sylviidae	<b>Cetti's Warbler</b>	<i>Cettia cetti</i>			+			+		
Muscicapidae	Pied Flycatcher	<i>Ficedula hypoleuca</i>		+		+	+		+	
Muscicapidae	Spotted Flycatcher	<i>Muscicapa striata</i>		+		+	+		+	
Timaliidae	Bearded Tit	<i>Panurus biarmicus</i>	+ (†)		+			+		
Aegithalidae	Long-tailed Tit	<i>Aegithalos caudatus</i>							+	
<b>Paridae</b>	<b>Great Tit</b>	<i>Parus major</i>	+ (‡‡)						+	
<b>Paridae</b>	<b>Blue Tit</b>	<i>Parus caeruleus</i>	+ (***)						+	
Certhiidae	Short-toed Tree Creeper	<i>Certhia brachydactyla</i>							+	
Remizidae	Penduline Tit	<i>Remiz pendulinus</i>	+ (†, ***)			+				
Oriolidae	Golden Oriole	<i>Oriolus oriolus</i>		+					+	
Laniidae	Red-backed Shrike	<i>Lanius collurio</i>		+		+	+			
Laniidae	Woodchat Shrike	<i>Lanius senator</i>		+		+	+			
<b>Corvidae</b>	<b>Common Magpie</b>	<i>Pica pica</i>	+ (*, ‡‡, F+ (**))					+	+	+
Corvidae	Eurasian Jay	<i>Garrulus glandarius</i>	+ (††)						+	
Corvidae	Carrion Crow	<i>Corvus corone</i>	+ (*, †, ‡‡)		+	+		+	+	+
<b>Corvidae</b>	<b>Jackdaw</b>	<i>Corvus monedula</i>			+	+		+	+	+
<b>Sturnidae</b>	<b>Common Starling</b>	<i>Sturnus vulgaris</i>	+ (†, *, ‡‡)		+	+	+	+	+	+
<b>Passeridae</b>	<b>Tree Sparrow</b>	<i>Passer montanus</i>	+ (†, *)					+	+	+
<b>Passeridae</b>	<b>House Sparrow</b>	<i>Passer domesticus</i>	+ (‡, †, §, *)					+	+	+
<b>Fringillidae</b>	<b>Greenfinch</b>	<i>Carduelis chloris</i>							+	
Fringillidae	European Serin	<i>Serinus serinus</i>							+	
<b>Fringillidae</b>	<b>Chaffinch</b>	<i>Fringilla coelebs</i>	+ (†, ‡‡)						+	
Fringillidae	Linnet	<i>Carduelis cannabina</i>	+ (††)						+	
<b>Fringillidae</b>	<b>Goldfinch</b>	<i>Carduelis carduelis</i>	+ (†)						+	
Emberizidae	Cirl Bunting	<i>Emberiza cirius</i>							+	
Emberizidae	Corn Bunting	<i>Miliaria calandra</i>							+	
<b>Emberizidae</b>	<b>Reed Bunting</b>	<i>Emberiza schoeniclus</i>	+ (††)		+	+		+		

\* Hubalek 2000

† Malkinson & Banet 2002

‡ Taylor et al 1956

§ Jamgaonkar et al 2003

\*\* Hars et al 2005

†† Buckley et al 2003 (PRNT 50)

‡‡ Buckley et al 2003 (PRNT 90)

§§ Banet-Noach 2004

\*\*\*Juricova et al 1987

††† Juricova et al 1989

**Table 4:** Bird species (in alphabetic order) respectively involved in the introduction, amplification or spread of West Nile virus in the Camargue, for which isolation was made or high viremia levels were observed (Malkinson and Banet 2002, Hubalek 2000, Lvov et al 2004).

	<b>Introductory birds</b>	<b>Amplifying birds</b>	<b>Spreading birds</b>
<b>High viremia levels</b>	Carrion Crow <i>Corvus corone</i>	Carrion Crow <i>Corvus corone</i>	Carrion Crow <i>Corvus corone</i>
	Common Pochard <i>Aythya ferina</i>	Common Kestrel <i>Falco tinnunculus</i>	Grey Heron <i>Ardea cinerea</i>
	Grey Heron <i>Ardea cinerea</i>	Common Pheasant <i>Phasianus colchicus</i>	House Sparrow <i>Passer domesticus</i>
	Northern Pintail <i>Anas acuta</i>	Grey Heron <i>Ardea cinerea</i>	
	Sand Martin <i>Riparia riparia</i>	House Sparrow <i>Passer domesticus</i>	
		Rock Dove <i>Columba livia</i>	
<b>WN virus isolation</b>	Black-headed Gull <i>Larus ridibundus</i>	Black-headed Gull <i>Larus ridibundus</i>	Black-headed Gull <i>Larus ridibundus</i>
	Carrion Crow <i>Corvus corone</i>	Carrion Crow <i>Corvus corone</i>	Carrion Crow <i>Corvus corone</i>
	Common Coot <i>Fulica atra</i>	Collared Dove <i>Streptopelia decaocto</i>	Common Magpie <i>Pica pica</i>
	Common Starling <i>Sturnus vulgaris</i>	Common Coot <i>Fulica atra</i>	Common Starling <i>Sturnus vulgaris</i>
	Cormorant <i>Phalacrocorax carbo</i>	Common Magpie <i>Pica pica</i>	Yellow-legged Gull <i>Larus cachinnans</i>
	Garganey <i>Anas querquedula</i>	Common Starling <i>Sturnus vulgaris</i>	
	Green Sandpiper <i>Tringa ochropus</i>	Little Tern <i>Sterna albifrons</i>	
	Lapwing <i>Vanellus vanellus</i>	Mallard <i>Anas platyrhynchos</i>	
	Little Tern <i>Sterna albifrons</i>	Turtle Dove <i>Streptopelia turtur</i>	
	Mallard <i>Anas platyrhynchos</i>	Yellow-legged Gull <i>Larus cachinnans</i>	
	Pied Wagtail <i>Motacilla alba</i>		
	Turtle Dove <i>Streptopelia turtur</i>		
	Yellow-legged Gull <i>Larus cachinnans</i>		

**Table 5:** List of bird species potentially involved in the introduction, amplification and spread of West Nile virus in the Camargue.

<b>Family</b>	<b>Species (English name)</b>	<b>Species (Latin name)</b>
Ardeidae	Cattle Egret	<i>Bubulcus ibis</i>
	Grey Heron	<i>Ardea cinerea</i>
Laridae	Yellow-legged Herring Gull	<i>Larus cachinnans</i>
	Mediterranean Gull	<i>Larus melanocephalus</i>
	Black-headed Gull	<i>Larus ridibundus</i>
Apodidae	Common Swift	<i>Apus apus</i>
Hirundinidae	Barn Swallow	<i>Hirundo rustica</i>
	House Martin	<i>Delichon urbica</i>
Motacillidae	Yellow Wagtail	<i>Motacilla flava</i>
Turdidae	Common Nightingale	<i>Luscinia megarhynchos</i>
Sylviidae	Melodious Warbler	<i>Hippolais polyglotta</i>
	Blackcap	<i>Sylvia atricapilla</i>
Corvidae	Carrion Crow	<i>Corvus corone</i>
	Jackdaw	<i>Corvus monedula</i>
Sturnidae	Common Starling	<i>Sturnus vulgaris</i>

**Séroprévalence chez les oiseaux migrateurs en  
provenance d’Afrique sub-saharienne**

---

***Article 3***

---

Article en préparation

***West Nile virus serosurvey on wild birds migrating  
from sub-Saharan Africa into Western Europe***



## West Nile virus serosurvey on wild birds migrating from sub-Saharan Africa into Western Europe

Elsa JOURDAIN<sup>a,b,c</sup>\*, Hervé ZELLER<sup>c</sup>, Philippe SABATIER<sup>a</sup>, Séverinne MURRI<sup>c</sup>, Yves KAYSER<sup>b</sup>, Michel GAUTHIER-CLERC<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Unité EPSP-TIMC, UMR 55-25, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon – Institut National de la Recherche Agronomique, 1 avenue Bourgelat, F-69280 Marcy l’Etoile, France

<sup>b</sup> Station Biologique de la Tour du Valat, Le Sambuc, F-13200 Arles, France

<sup>c</sup> National Reference Centre for Arboviruses, Institut Pasteur, IFR 128, 21 avenue Tony Garnier, F-69365 Lyon cedex 07, France

\* Corresponding author: e.jourdain@vet-lyon.fr

### Short title

West Nile virus in migrating birds

### Abstract

Recent West Nile virus (WNV) outbreaks have occurred in the western Mediterranean basin, including France (in 2000 and 2003) where the virus had not been reported since the 1960s. Migratory birds were suspected of introducing WNV from sub-Saharan Africa. We report the results of a serosurvey conducted on bird migrants, mainly passerines, during the spring 2004 in the Camargue (Rhône delta), a Mediterranean wetland in southern France. This wetland is one of the main stopping points for numerous migratory birds refuelling after crossing the Sahara and the Mediterranean Sea. WNV neutralizing antibodies were found in eight species known to winter in sub-Saharan Africa (Willow Warbler *Phylloscopus trochilus*, Whitethroat *Sylvia communis*, Blackcap *Sylvia atricapilla*, Common Redstart *Phoenicurus phoenicurus*, Pied Flycatcher *Ficedula hypoleuca*, Chiffchaff *Phylloscopus collybita*, Woodchat Shrike *Lanius senator*, and Hoopoe *Upupa epops*). Seroprevalence in bird migrants was 1.6 to 5.7% and approximately 2% were infected with hard ticks. Three scenarios of WNV introduction by birds from sub-Saharan Africa into Western Europe are suggested and discussed.

### Keywords

West Nile virus / wild birds / migration / serosurvey / Western Europe



## INTRODUCTION

Responsible for infections in humans, horses and birds, West Nile virus (WNV, Flaviviridae, *Flavivirus*) is an arbovirus widely distributed in Africa, Europe, Asia, the Middle East and, since 1999, America [21, 32, 46, 49, 64]. First studied in Egypt in the 1950s [62], the role of birds in WNV epidemiology is currently well established [35, 38]. Bird migration, in particular, is believed to play a major role in WNV dissemination over long distances [35, 50, 63].

Since 1994, several outbreaks of WNV infection have been reported in the western Mediterranean basin (Algeria, Morocco, Tunisia, Italy), including in southern France [9, 44, 59]. As WNV is endemic in sub-Saharan Africa [46], migratory birds were suspected to be responsible for the reemergence of WNV in France where the virus had not been reported during the last 35 years [28, 45]. In order to identify migratory bird species likely to introduce WNV from sub-Saharan Africa into Western Europe, a serosurvey was conducted in 2004 in the Camargue, a coastal Mediterranean wetland where WNV cases occurred both in the 1960s and in 2000 [45] and where numerous long distance migrants stop to refuel during spring migration [5]. As passerine birds are believed to be the most competent for WNV transmission [31], investigations were focused on migratory passerines.

The objective of this article is to provide a comprehensive analysis of the mechanisms by which sub-Saharan migrants might introduce WNV into Western Europe.

## MATERIALS AND METHODS

### Field investigations

Migratory passerine birds were captured with mist nets during the spring migration, from April 1st to May 12, 2004. Nets were placed in the bushes located a few hundred meters behind the Piémanson beach, south-east of Salins-de-Giraud, in an attempt to capture migratory birds preferentially right after their crossing of the Mediterranean Sea (Figure 1). The species, sex, and age, was determined for each bird. Ticks found attached to the head were removed. Each bird was tagged with a ring delivered by the *Museum National d'Histoire Naturelle* (Paris) and bled from the brachial vein before being released. Blood samples were centrifuged and plasma was kept frozen at -20 °C prior testing.

### Serologic assays

Bird plasma was screened for the presence of WNV specific immunoglobulin G (IgG). Previous studies [15] reported that IgG antibodies of species from several avian orders were detectable by using commercially available anti-wild bird horseradish peroxidase-conjugated antibodies (A140-110P, Bethyl Laboratories, Montgomery, TX). The binding ability of this reagent was evaluated for 24 of the species sampled in our study. Only the samples from

species with a sustainable binding ability were tested using an in-house indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method [45].

Plasma samples of other species were tested with a microneutralization assay adapted from Malkinson et al. [36] using the France 05.21/00 WNV equine strain (GenBank accession no. AY268132) and crystal violet staining. Results were considered positive for titres greater than or equal to 80 (the choice of this high cut-off value is justified by the fact that cross-reactions may occur with other close related flaviviruses). Specimens tested using the ELISA method were also submitted to the microneutralization test when volume was suitable.

Seroprevalence confidence intervals were calculated for a risk error of 5% using the Binomial Law.

## RESULTS

### Bird species

A total of 471 samples from 32 species were tested with the ELISA test (n=39), the microneutralization test (n=380), or both (n=52) (Table I). For most species, only a few individuals were tested. Four species were better represented with at least 50 individuals tested (Willow Warbler *Phylloscopus trochilus*, Blackcap *Sylvia atricapilla*, Eurasian Robin *Erithacus rubecula*, Common Redstart *Phoenicurus phoenicurus*).

Among these 32 species, only 17 are strictly long distance migrants with all the individuals spending the winter in sub-Saharan Africa. For four species (Blackcap, Chiffchaff *Phylloscopus collybita*, Yellow Wagtail *Motacilla flava*, Wryneck *Jynx torquilla*), some individuals remain in the Mediterranean Basin whereas others fly south to sub-Saharan Africa. Birds from 11 species known to stay in the Mediterranean basin during the winter period were also sampled (Table I).

### Indirect ELISA test

For five species of the order Passeriformes (Chiffchaff, Eurasian Robin, Barn Swallow *Hirundo rustica*, House Sparrow *Passer domesticus*, Tree Sparrow *Passer montanus*), IgG antibodies were detectable by using the commercially available anti-wild bird horseradish peroxidase conjugate. Plasma samples of the corresponding species (n=91) were tested for the presence of WNV antibodies using the indirect ELISA method (Table I). They were all negative.

### Neutralization test

Out of the 432 samples tested with the microneutralization test, 39 showed some cell toxicity and could not be included in the study. Among the 393 plasma samples left, 11 showed titres greater than or equal to 80 (Table I). They all belonged to species classified as possibly or strictly sub-Saharan migrants (Willow Warbler, Whitethroat *Sylvia communis*,

Blackcap, Common Redstart, Pied Flycatcher *Ficedula hypoleuca*, Woodchat Shrike *Lanius senator*, Hoopoe *Upupa epops*). Seroprevalence in birds possibly coming from sub-Saharan Africa (n=339) was 3.2% [1.6-5.7]. Interestingly, the few birds (n=8) which reacted positively at the titre 40 also belonged to long distance migrant species (Willow Warbler, Blackcap, Common Redstart and Common Nightingale *Luscinia megarhynchos*).

### Ticks

Twenty-one ticks were removed from 11 of the 471 birds tested in WNV serology (Table I). According to these results, 1.8% of the sub-Saharan migrants (7/384) were carrying one or several ticks. All of them were hard tick nymphs or larvae.

## DISCUSSION

### Spring migrants: carriers of WNV antibodies and hard ticks

The results of this survey indicate that 1.6 to 5.7% of the bird migrants which stopped in the Camargue in spring 2004, during their journey from sub-Saharan Africa to Europe, were carrying WNV antibodies. The detection of antibodies in a sample only indicates that the corresponding bird has been in contact with WNV. It is not known how long WNV specific antibodies can be detected in the blood of migratory species such as those investigated in this study. However, experimental data obtained on birds of the order Columbiformes suggest that WNV antibodies may remain detectable in birds for more than a year [18, 37]. Consequently, it is not possible to be sure that birds with positive serology were in contact with WNV during their recent wintering time in sub-Saharan Africa. But, as WNV is known to be endemic there [46], and as antibody titres decrease with time [58], this a very probable situation, particularly for birds with titres greater than 80.

A few hard ticks were collected from spring migrating passerines but others were undoubtedly overlooked given the fact that birds were simply examined with the naked eye [12, 30]. There is a high likelihood that the proportion of infested birds (1.8%) is underestimated. Nevertheless, it is close to the prevalence found during other studies on spring migrating birds in Northern Europe [7, 48] and in the Mediterranean basin [22, 23, 30].

Even if prevalence levels within the whole bird population are rather low, the total number of birds which arrive in Western Europe with WNV infection or WNV infected ticks may be high. Indeed, it is estimated that, during autumn migration, approximately five billion birds fly to Africa on a broad front from Portugal to Turkey [41]. It would mean that, each day, during the fall, about 50,000 birds fly over a one mile portion of the Mediterranean coast. Numbers are half lower in spring because of winter mortality, particularly in juveniles, but these estimations provide a general idea of the number of individuals that fly daily in Western Europe in spring. Some of these birds, which have been in contact with WNV in Africa or transport WNV infected ectoparasites, might introduce WNV in the areas where they stop.

Three main scenarios can be suggested to explain how migratory birds might introduce WNV from sub-Saharan Africa into Western Europe (Figure 2). Scenario 1: birds become infected by WNV virus shortly before leaving sub-Saharan Africa and are still viremic when they reach the European continent. Scenario 2: birds are chronically infected and become viremic because of the stress associated with the spring migration. Scenario 3: birds might carry infected ectoparasites that could later infect other birds in Western Europe. These scenarios will be successively considered and discussed taking the examples of long distance passerine migrants and the Camargue area.

### **Introduction of WNV by viremic birds infected shortly before migration**

This scenario might occur if migratory birds successively (i) become infected with WNV before they leave sub-Saharan Africa, (ii) are still viremic for the virus when they reach the European Mediterranean coast and (iii) contaminate local competent mosquito vectors.

During spring migration, passerine birds as small as the Willow Warbler, which weighs no more than 7 grams, have to cross two major ecological barriers represented by the Sahara desert and the Mediterranean Sea. To make this journey possible, birds need to build large quantities of body reserves, namely fat and glycogen as fuel and protein in muscles. They consequently have to find areas with sufficient amount of food available. As spring migration takes place before the rainy season, drought is severe on the steppes south of the Sahara and birds tend to concentrate in the verdant land still remaining around rivers and lakes such as Senegal and Niger. In these areas, birds might encounter WNV infected mosquito vectors and become infected with WNV. Some birds, with exceedingly large fat reserves, also start flying from areas further south [2], at latitudes where the WNV cycle is likely to be active year round [17, 39, 47]. As a result, WNV might indeed infect many passerines before they start to migrate.

Passerine birds cross the Sahara and the Mediterranean Sea on a broad front. Depending on their departure location, they have to fly about 2,500 to 3,500 kilometres before they reach the European Mediterranean coast. If they begin their flight with large fat reserves, they might manage to cross both the Sahara and the Mediterranean Sea without stopping. However, most birds land and refuel in North Africa where, after the winter rains, they find greenery and good stopover sites [2]. Some birds also stop to rest in desert oases. The main difficulty during this journey is the wind, as north and north-east trade winds predominate over the desert. The speed in neutral winds is believed to be about 35 km/h but it would reach 50 km/h with periodic tail winds [2]. At this speed, with sufficient fat storage, birds should be able to reach the northern Mediterranean coast within 50-100 hours of flight (*i.e.* 2-4 days).

According to experimental infection trials [31, 56, 62], WNV viremia in birds is usually detected only for 3-7 days. It suggests that, even if birds migrate from sub-Saharan Africa to Mediterranean Europe without stopping, the viremia duration expected to be left once they are

in Europe is rather short. However, only a few bird species have been experimentally tested for WNV infection and viremia profiles might be different for the small passerine species discussed in this article. Moreover, it is likely that measures of viremia duration assessed under experimental conditions do not correspond to the real duration experienced by a bird at the time of spring migration. Migration is indeed very stressful for birds because of physiological constraints (body mass changes, muscular effort associated with flapping flight, sleep deprivation) and behavioural reactions to environmental factors (bad weather conditions, food availability, disposition of stopover habitats, predation risk and competition) [27]. Because of stress-induced immunosuppression, birds might become more sensitive to WNV infection [4] and express longer and higher viremia titres. In House Finches *Carpodacus mexicanus* infected with viruses closely related to WNV, namely Saint Louis Encephalitis virus (SLE, Flaviviridae, *Flavivirus*) and Western Equine Encephalitis virus (WEE, Togaviridae, *Alphavirus*), enhancement of the amplitude and the duration of the viremia response was experimentally observed after inoculation with chemical immunosuppressive components [55]. Similarly, if viremia duration in birds was prolonged because of migration stress, it would become more likely that birds infected in sub-Africa shortly before leaving might arrive in a viremic state on the northern Mediterranean coast.

WNV virus transmission from infected migratory birds might occur in Western Europe if competent mosquito vectors are in activity while migratory birds are still viremic and if environmental temperatures are high enough to allow virus amplification in arthropod vectors [14]. In the Camargue, the ornithophilic mosquito species *Culex modestus* Ficalbi is believed to be the main WNV amplification vector [42]. After winter hibernation, female *Cx. modestus* mosquitoes become active in February, are very aggressive in April, and then die [42]. As larvae have not yet emerged, *Cx. modestus* populations gradually decrease and become quite low in late April and early May. Larvae development is slow because of low temperatures and the first adults emerge only in late May [42]. Afterwards, populations are very abundant until late October. On the other hand, long distance migratory passerines are observed in the Camargue from early March to late May, with a peak in April and early May [5]. Looking at *Cx. modestus* population fluctuations, it seems very unlikely that a local bird-to-bird mosquito cycle might begin before late May, when mosquito vectors are abundant. This means that only the birds which arrive in a viremic state late in the migratory season would be likely to set off a WNV transmission cycle in a Mediterranean wetland like the Camargue.

To sum up, this scenario of WNV introduction into Western Europe by viremic migratory birds might occur but several conditions on mosquito vector activity (both in Africa and Europe) and on bird flight duration are required. This might be the reason why WNV emergence is greatly variable and unpredictable from year to year, and has never been described in Northern Europe.

### **Introduction of WNV by chronically infected birds**

In areas where temperature conditions in spring are much colder and probably too low to allow WNV amplification in arthropods, such as Russia, the possibility for WNV to be introduced by viremic birds infected shortly before leaving sub-Saharan Africa is even less likely. The fact that WNV strains isolated in the Volga Delta were shown to be antigenetically related to strains isolated in different parts of Africa suggests however that there is a gene flow between these two remote areas. It was hypothesized that birds probably arrive with a chronic infection which aggravates owing to the change of their physiological state caused by migration [16]. Chronic forms of arbovirus infections have been described in various species [33, 52, 53, 54, 57, 60], and some models in mammals revealed that, in persistently infected animals, viral replication might occur when immune responses are impaired or suppressed [40]. In birds, such a relapse could be expected due to the stress associated with migration, as it was experimentally demonstrated for *Borrelia* infection [20]. However, investigations on House Finches experimentally infected with SLE or WEE did not succeed in showing a relapse in chemically immunosuppressed individuals [53, 55].

Further investigations are necessary to determine whether birds chronically infected with WNV might take part again in the WNV cycle. If this scenario occurs, all the birds in contact with WNV in Africa have to be regarded as potentially involved in WNV introduction. Indeed, contrary to scenario 1, their migration speed and their arrival time in the Camargue are no longer key elements for WNV introduction.

### **Introduction of WNV by ectoparasites carried by birds**

Another possibility for the introduction of WNV from Africa into Eurasia is by the way of migratory bird ectoparasite passengers. Birds are known to be parasitized by a high diversity of arthropods, including ticks, mites, lice, true bugs, fleas and flies [26]. Hard ticks (Ixodidae) and soft ticks (Argasidae) are particularly suspected in WNV transmission as virus isolations have occasionally been reported from ticks, both in Eurasia and Africa [16, 24, 34, 43, 46]. WNV might be introduced into Western Europe by bird carried ticks if the following conditions are met: (i) ticks attach on a migrating bird before its departure to its breeding land; (ii) they should already be infected or become infected on their migrating bird host; (iii) they should drop from their host in Western Europe and survive there long enough to transmit WNV infection to a new bird host.

Ticks are temporary parasites which remain attached to their host while they are having their blood meal and then drop. All Ixodid tick stages remain on their host for a few days or weeks, depending on the species [19]. Conversely, in soft ticks, which usually feed on nestlings at night and hide during the day, only larvae remain attached to their bird host for a few days [19]. Consequently, whereas in hard ticks all stages are likely to be found on migratory birds, only larvae are likely with soft ticks. Field data (including the present study,

see Table I) revealed that spring migrating birds captured in the Mediterranean region carry hard and, less frequently, soft ticks, which attached in sub-Saharan Africa [23, 30]. These ticks, which are mostly larvae and nymphs, are dropped by birds along their migratory route as revealed by the occasional recovery of typical African tick species in Eurasia, far from their normal geographic range [13, 22].

Ticks (Ixodid or Argasid larvae, Ixodid nymphs, or Ixodid females) might become infected by WNV if their bird host is viremic for the virus, a possibility already discussed above. Conversely, some ticks already infected by WNV, because of transovarial (larvae) or transstadial (nymphs and females) transmission, might attach to a naive bird. Until now, the passage of WNV has been experimentally documented from infected females to larvae in an Argasid species [1]. It was also described in some Ixodid species from infected larvae to nymphs and from an infected nymph to a male but vector competency could not be demonstrated [3]. The presence in Africa of untested competent vector tick species, which might attach to migratory birds, is however possible.

If these infected ticks drop from their bird host in Western Europe, they will have to moult to the next stage or lay eggs for Ixodid females. The following stage (an Argasid or Ixodid nymph, an Ixodid female, or numerous Ixodid larvae) will later need to find a new host to have a blood meal. The time interval between the moment ticks leave their host and when they are ready to find a new one depends on local hygrometric and temperature conditions [8, 19]. A high mortality can be expected during this period, particularly for exotic tick species used to different environmental conditions. Individuals that survived, and in which WNV was transmitted from the previous stage, might be able to contaminate a new host only if they belong to a species competent for WNV transmission. To sum up, if ticks have arrived in spring with WNV infection, they might be able to transmit the virus to local birds only if: (i) they have been able to survive, moult (or lay eggs) (ii) at the next stage, they have been able to find a new host, which might be a bird or another vertebrate species, (iii) WNV has been transmitted transstadially (or transovarially), and (iv) they belong to competent vector species, i.e. if they are able to transmit WNV infection while feeding on a host. The succession of these conditions makes the whole scenario rather unlikely.

Conversely, since transmission of WNV by ingestion has been reported in birds in laboratory conditions [31], local birds might become infected by feeding on infected ticks brought in the Camargue by migratory congeners. Under this scenario, it would be possible for local Camargue birds to become infected in late April or early May even if local competent mosquito vectors are scarce.

### **Conclusions and perspectives**

Further research is needed to determine which of the three suggested scenarios for WNV introduction from sub-Saharan Africa into Western Europe is the most likely. Experimental

infection of palearctic migratory birds, in particular, would be useful to know whether these species are able to sustain long viremia durations. The possibility of a relapse of infection should also be assessed for these species when they are placed under stressful conditions.

Further studies are needed in Africa, where WNV is considered endemic. Surveys on human or equine populations in Africa reveal a high level of IgG antibodies [6, 11, 47] and WNV is often detected in mosquito pools [10, 39, 61] but large scale and long term ecological and epidemiological investigations are drastically lacking. The isolation and complete sequencing of WNV strains in Africa might also be helpful to determine where WNV strains isolated in Western Europe originate from.

More data on exotic ticks survival possibilities in Europe and on the probability for birds to become infected with WNV after ingesting an infected tick are also needed, as well as better knowledge on WNV competent vector species within Europe. The possibility that resident predators (e.g. raptors) become infected by eating infected birds, as observed in America [25, 29, 51], should also be investigated.

All these investigations should gradually lead to a better understanding of how WNV might be transported by birds between Africa and Eurasia. As it is likely that introduction of WNV is a necessary but an insufficient step to trigger WNV circulation in Western Europe, research should also aim at describing the factors that favour WNV amplification and explaining which conditions are necessary for the virus to become endemic.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We are grateful to the people who helped do the field work (A. Arnaud and other bird ringers) and the laboratory work (S. Reynard and C. Faure). We are very thankful to T. Balenghien for fruitful discussions and to C. Farmer who accepted to critically read our manuscript. We also thank the CNES (French National Centre for Spatial Studies), the INRA (French National Institute for Research in Agronomy) and the Région Provence-Alpes-Côte d'Azur who financially supported this study.



## REFERENCES

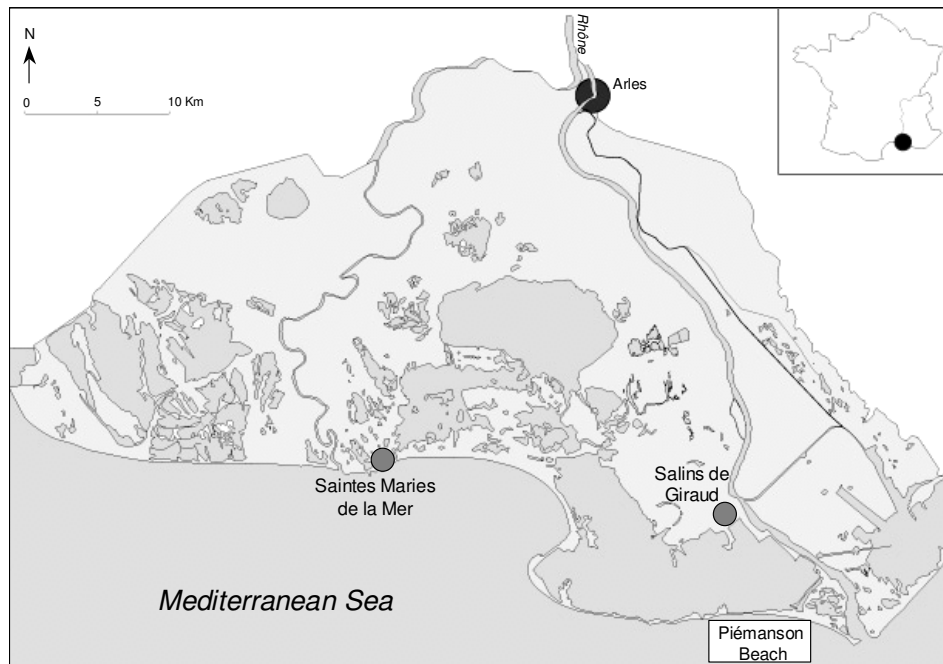
- [1] Abbassy M.M., Osman M., Marzouk A.S., West Nile virus (Flaviviridae: Flavivirus) in experimentally infected Argas ticks (Acari: Argasidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48 (1993) 726–737.
- [2] Alerstam T. (translated by Christie D.A.), *Bird migration*, Cambridge University Press, Cambridge, 1990.
- [3] Anderson J.F., Main A.J., Andreadis T.G., Wikel S.K., Vossbrinck C.R., Transstadial transfer of West Nile virus by three species of ixodid ticks (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 40 (2003) 528–533.
- [4] Ben-Nathan D., Stress and infectious diseases. *Israel J. Vet. Med.* 49 (1994) 105–112.
- [5] Blondel J., Isenmann P., *Guide des oiseaux de Camargue*, Delachaux & Niestlé, Neuchâtel-Paris, 1981.
- [6] Cabre O., Durand J.P., Prangé A., Gomez J., Maurizi L., Tolou H., Davoust B., Infection par le virus West Nile : enquêtes sérologiques sur des chevaux en France et en Afrique. *Med. Trop.* 65 (2005) 439–443.
- [7] Comstedt P., Bergström S., Olsen B., Garpmo U., Marjavaara L., Mejlom H., Barbour A.G., Bunikis J., Migratory passerine birds as reservoirs of Lyme borreliosis in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 12 (2006) 1087–1095.
- [8] Daniel M., Dusbabek F., Micrometeorological and microhabitat factors affecting maintenance and dissemination of tick-borne diseases in the environment, in: Sonenshine D.E., Mather T.N. (Eds.), *Ecological dynamics of the tick-borne diseases*, Oxford University Press, Oxford, 1994, pp. 91–138.
- [9] Del Giudice P., Schuffenecker I., Vandebos F., Counillon E., Zeller H., Human West Nile virus, France. *Emerg. Infect. Dis.* 10 (2004) 1885–1886.
- [10] Diallo M., Nabeth P., Ba K., Sall A.A., Ba Y., Mondo M., Girault L., Abdalahi M.O., Mathiot C., Mosquito vectors of the 1998-1999 outbreak of Rift Valley Fever and other arboviruses (Bagaza, Sanar, Wesselsbron and West Nile) in Mauritania and Senegal. *Med. Vet. Entomol.* 19 (2005) 119–126.
- [11] Digoutte J.P., Nguyen Trung Luong P., Contribution à l'étude des arboviroses en Afrique Centrale. I Enquête immunologique chez l'Homme dans le centre et l'ouest de la République Centrafricaine. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 6 (1968) 803–817.
- [12] Doby J.M., Méthode de récolte des tiques Ixodidae sur les oiseaux. *Bull. Soc. Franç. Parasitol.* 14 (1996) 217–222.
- [13] Doby J.M., Bigaignon G., Tiques Ixodidae parasites d'oiseaux et leur rôle pathogène. *Revue Méd Vét* 148 (1997) 853–860.
- [14] Dohm D.J., O'Guinn M.L., Turell M.J., Effect of environmental temperature on the ability of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile virus. *J. Med. Entomol.* 39 (2002) 221–225.
- [15] Ebel G.D., Dupuis A.P., Nicholas D., Young D., Maffei J., Kramer L.D., Detection by enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies to West Nile virus in birds. *Emerg. Infect. Dis.* 8 (2002) 979–982.
- [16] Gaidamovich S.Y., L'Vov D K., Arboviruses, in: Zhdanov V.M. (Ed.), *Actual problems of virology and viral infections*, Vses. Nauch.-Issled Inst. Meditsin. Med.-Tekhn. Informats, Minist Zdravookhr SSSR, Moscow, 1973, pp. 3–31.
- [17] Georges A.J., Lesbordes J.L., Georges-Courbot M.C., Meunier D.M.Y., Gonzalez J.P., Fatal hepatitis from West Nile virus. *Ann. Inst. Pasteur Virol.* 138 (1987) 237–444.

- [18] Gibbs S.E., Hoffman D.M., Stark L.M., Marlenee N.L., Blitvich B.J., Beaty B.J., Stallknecht D.E., Persistence of antibodies to West Nile virus in naturally infected rock pigeons (*Columba livia*). *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12 (2005) 665–667.
- [19] Guigen C., Degeilh B., Les tiques d'intérêt médical : rôle vecteur et diagnose de laboratoire. *Rev. Fr. Lab.* 338 (2001) 49–57.
- [20] Gylfe A., Bergstrom S., Lundstrom J., Olsen B., Reactivation of *Borrelia* infection in birds. *Nature* 403 (2000) 724–725.
- [21] Hayes C.G., West Nile fever, in: Monath T.P. (Ed), *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, CRC Press, Boca Raton, 1989, pp. 59–88.
- [22] Hoogstraal H., Kaiser M.N., Ticks from European-Asiatic birds migrating through Egypt into Africa. *Science* 133 (1961) 277–278.
- [23] Hoogstraal H., Traylor M.A., Gaber S., Malakatis G., Guindy E., Helmy I., Ticks (Ixodidae) on migrating birds in Egypt, spring and fall 1962. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 30 (1964) 355–367.
- [24] Hubalek Z., Halouzka J., West Nile fever: a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 5 (1999) 643–650.
- [25] Hull J., Hull A., Reisen W., Fang Y., Ernest H., Variation of West Nile virus antibody prevalence in migrating and wintering hawks in central California. *Condor* 108 (2006) 435–439.
- [26] Janovy J., Protozoa, helminths, and arthropods of birds, in: Clayton D.H. and Moore J. (Eds.), *Host-parasite evolution: general principles and avian models*, Oxford University Press: Oxford. 1997, pp. 303–337.
- [27] Jenni L., Schaub M., Behavioural and physiological reactions to environmental variation in bird migration: a review, in: Berthold P., Gwinner E., and Sonnenschein E. (Eds.), *Avian migration*, Springer-Verlag, Berlin, 2003, pp. 155–171.
- [28] Jourdain E., Toussaint Y., Leblond A., Bicout D.J., Sabatier P., Gauthier-Clerc M., Bird species potentially involved in introduction, amplification and spread of West Nile virus in a Mediterranean wetland, the Camargue (southern France). *Vector Borne Zoonotic Dis.* (2007), *in press*.
- [29] Joyner P.H., Kelly S., Shreve A.A., Snead S.E., Sleeman J.M., Pettit D.A., West Nile virus in raptors from Virginia during 2003: clinical, diagnostic, and epidemiologic findings. *J. Wild. Dis.* 42 (2006) 335–344.
- [30] Kaiser M.N., Hoogstraal H., Ticks (Ixodidae) on migrating birds in Cyprus, fall 1967 and spring 1968, and epidemiological considerations. *Bull. Entomol. Res.* 64 (1974) 97–110.
- [31] Komar N., Langevin S., Hinten S., Nemeth N., Edwards E., Hettler D., Davis B., Bowen R., Bunning M., Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.* 9 (2003) 311–322.
- [32] Komar N., West Nile virus: epidemiology and ecology in North America. *Adv. Virus Res.* 61 (2005) 185–234.
- [33] Kuno G., Persistence of arboviruses and antiviral antibodies in vertebrate hosts: its occurrence and impacts. *Rev. Med. Virol.* 11 (2001) 165–190.
- [34] Lvov D.K., Butenko A.M., Gromashevskii V.L., Kovtunov A.I., Prilipov A.G., Kinney R.M., Aristova V.A., Dzharkenov A.F., Samokhvalov E.I., Savage H.M., Shchelkanov M.Y., Galkina I.V., Deryabin P.G., Gubler D.J., Kulikova L.N., Alkhovsky S.K., Moskvina T.M., Zlobina L.V., Sadykova G.K., Shatalov A.G., Lvov D.N., Usachev V.E., Voronina A.G., West Nile and other zoonotic viruses in Russia: examples of emerging-reemerging situations. *Arch. Virol. (suppl)* 18 (2004) 85–96.

- [35] Malkinson M., Banet C., The role of birds in the ecology of West Nile virus in Europe and Africa. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 267 (2002) 309–322.
- [36] Malkinson M., Banet C., Weisman Y., Pokamunski S., King R., Drouet M.T., Deubel V., Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. *Emerg. Infect. Dis.* 8 (2002) 392–397.
- [37] McIntosh B.M., Madsen W., Dickinson D.B., Ecological studies on Sindbis and West Nile viruses in South Africa. VI. The antibody response of wild birds. *S. Afr. J. Med. Sci.* 34 (1969) 83–91.
- [38] McLean R.G., Ubico S.R., Docherty D.E., Hansen W.R., Sileo L., McNamara T.S., West Nile virus transmission and ecology in birds. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 951 (2001) 54–57.
- [39] Miller B.R., Nasci R.S., Godsey M.S., Savage H.M., Lutwama J.J., Lanciotti R.S., Peters C.J., First field evidence for natural vertical transmission of West Nile virus in *Culex univittatus* complex mosquitoes from Rift Valley Province, Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62 (2000) 240–246.
- [40] Monath T.P., Heinz F.X., Flaviviruses, in: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., Chanock R.M., Monath T.P., Melnick J.L., Roizman B., Straus S.E. (Eds.), *Fields virology*, Raven Publishers, Philadelphia, 1996, pp. 961–1034.
- [41] Moreau, *The Palearctic-African bird migration systems*, Academic Press Inc., London, 1972.
- [42] Mouchet J., Rageau J., Laumond C., Hannoun C., Beytout D., Oudar J., Corniou B., Chippaux A., Epidémiologie du virus West Nile : étude d'un foyer en Camargue. V. Le vecteur : *Culex modestus* Ficalbi Diptera; Culicidae. *Ann. Inst. Pasteur. (Paris)* 118 (1970) 839–855.
- [43] Mumcuoglu K.Y., Banet-Noach C., Malkinson M., Shalom U., Galun R., Argasid ticks as possible vectors of West Nile virus in Israel. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 5 (2005) 65–71.
- [44] Murgue B., Murri S., Triki H., Deubel V., Zeller H.G., West Nile in the Mediterranean basin: 1950-2000. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 951 (2001) 117–126.
- [45] Murgue B., Murri S., Zientara S., Durand B., Durand J.P., Zeller H., West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years. *Emerg. Infect. Dis.* 7 (2001) 692–696.
- [46] Murgue B., Zeller H., Deubel V., The ecology and epidemiology of West Nile virus in Africa, Europe and Asia. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 267 (2002) 195–221.
- [47] Nur Y.A., Groen J., Heuvelmans H., Tuynman W., Copra C., Osterhaus A.D., An outbreak of West Nile fever among migrants in Kisangani, Democratic Republic of Congo. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61 (1999) 885–888.
- [48] Olsen B., Jaenson T.G., Bergstrom S., Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato-infected ticks on migrating birds. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 3082–3087.
- [49] Petersen L.R., Roehrig J.T., West Nile virus: a reemerging global pathogen. *Emerg. Infect. Dis.* 7 (2001) 611–614.
- [50] Rappole J.H., Derrickson S.R., Hubalek Z., Migratory birds and spread of West Nile virus in the Western Hemisphere. *Emerg. Infect. Dis.* 6 (2000) 319–328.
- [51] Rappole J.H., Compton B.W., Leimgruber P., Robertson J., King D.I., Renner S.C., Modeling movement of West Nile virus in the Western hemisphere. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 6 (2006) 128–139.
- [52] Reeves W.C., Overwintering of arboviruses. *Prog. Med. Virol.* 17 (1974) 193–220.

- [53] Reisen W.K., Kramer L.D., Chiles R.E., Green E.N., Martinez V.M., Encephalitis virus persistence in California birds: preliminary studies with House Finches. *J. Med. Entomol.* 38 (2001) 393–399.
- [54] Reisen W.K., Chiles R.E., Green E.N., Fang Y., Mahmood F., Previous infection protects house finches from re-infection with St. Louis encephalitis virus. *J. Med. Entomol.* 40 (2003) 300–305.
- [55] Reisen W.K., Chiles R.E., Green E.N., Fang Y., Mahmood F., Martinez V.M., Laver T., Effects of immunosuppression on encephalitis virus infection in the house finch, *Carpodacus mexicanus*. *J. Med. Entomol.* 40 (2003) 206–214.
- [56] Reisen W.K., Fang Y., Martinez V.M., Avian host and mosquito (Diptera: Culicidae) vector competence determine the efficiency of West Nile and St. Louis encephalitis virus transmission. *J. Med. Entomol.* 42 (2005) 367–375.
- [57] Reisen W.K., Fang Y., Lothrop H.D., Martinez V.M., Wilson J., O'Connor P., Carney R., Cahoon-Young B., Shaffii M., Brault A.C., Overwintering of West Nile virus in Southern California. *J. Med. Entomol.* 43 (2006) 344–355.
- [58] Ritchie B.W., Avian viruses: function and control, Wingers Publishing, Inc., Lake Worth, 1995.
- [59] Schuffenecker I., Peyrefitte C.N., el Harrak M., Murri S., Leblond A., Zeller H.G., West Nile virus in Morocco, 2003. *Emerg. Infect. Dis.* 11 (2005) 306–309.
- [60] Thomas L.A., Eklund C.M., Overwintering of Western Equine Encephalitis virus in experimentally infected garter snakes and transmission to mosquitoes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 105 (1960) 52–55.
- [61] Traore-Lamizana M., Zeller H.G., Mondo M., Hervy J.P., Adam F., Digoutte J.P., Isolations of West Nile and Bagaza viruses from mosquitoes (Diptera: Culicidae) in central Senegal (Ferlo). *J. Med. Entomol.* 31 (1994) 934–938.
- [62] Work T.H., Hurlbut H.S., Taylor R.M., Indigenous wild birds of the Nile Delta as potential West Nile virus circulating reservoirs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 4 (1955) 872–888.
- [63] Zeller H.G., Murgue B., Rôle des oiseaux migrateurs dans l'épidémiologie du virus de West Nile. *Med. Mal. Infect.* 31 [suppl 2] (2001) 168–174.
- [64] Zeller H.G., Schuffenecker I., West Nile virus: an overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 23 (2004) 147–156.

**Figure 1: Map of the Camargue area showing the study site.**

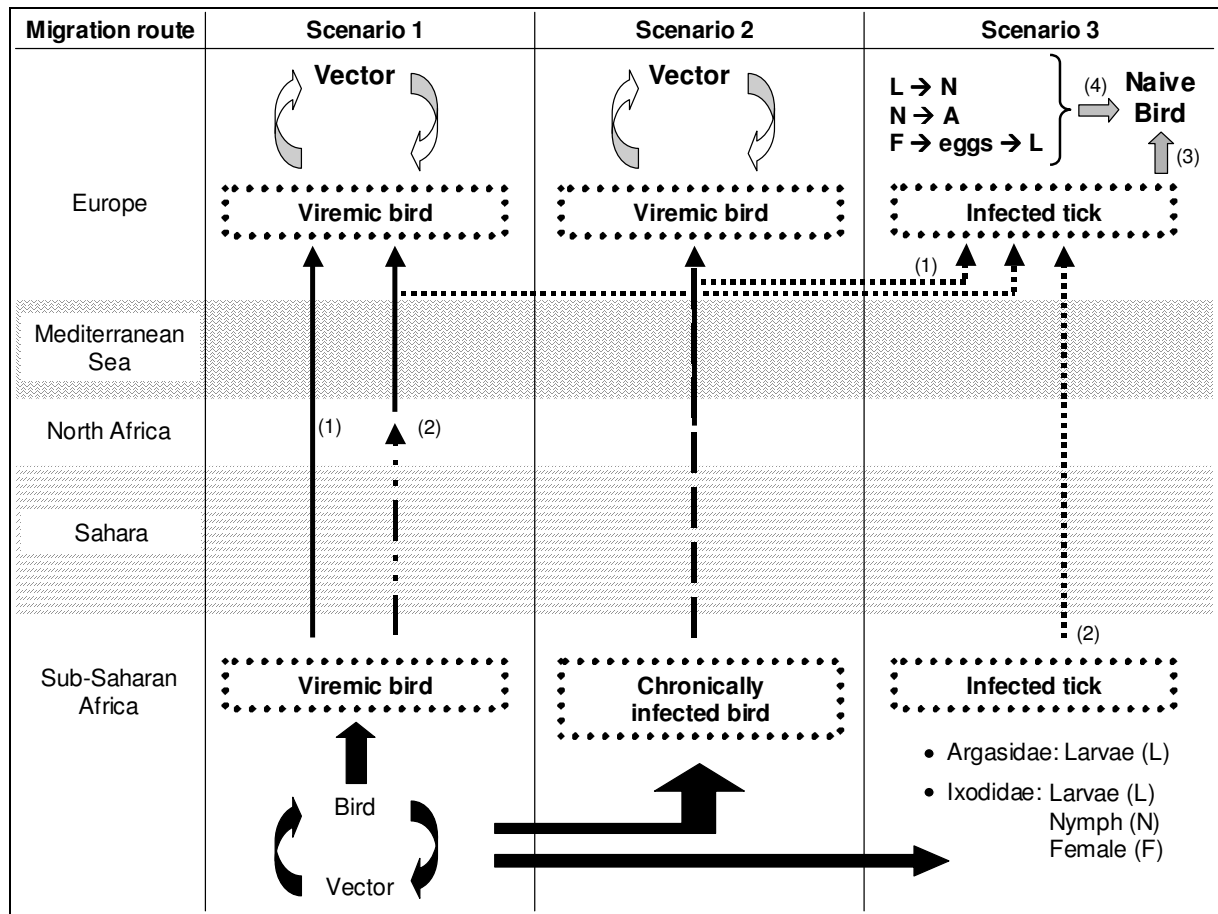


**Figure 2: Suggested scenarios for West Nile virus (WNV) introduction from sub-Saharan Africa into Europe.**

Scenario 1: Birds become infected by WNV virus shortly before leaving sub-Saharan Africa. They are still viremic when they reach the European continent because they flew rapidly into Europe (1) or, if they made stopovers on their way, because the migration stress increases the duration of viremia (2). In Europe, they contaminate competent vectors.

Scenario 2: Birds chronically infected with WNV become viremic because of a relapse of infection during migration. In Europe, they contaminate competent vectors.

Scenario 3: Ticks are brought into Europe from migrating birds. These ticks became infected by WNV by feeding on an infected migrating bird (1) or were infected before their departure from sub-Saharan Africa (2). They transmit WNV infection to a new bird by being eaten (3) or, after moulting, by feeding on a new host (4).



**Table I:**

Results of West Nile virus (WNV) serological investigations using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and/or microneutralization test. Species are classified according to whether their wintering land is located in sub-Saharan Africa for all individuals (YES), some individuals (POSSIBLY) or no individual (NO). Species with individuals positive in WNV serology are written in bold.

	Winter in sub-Saharan Africa	Bird species: (English name)	Bird species: (Latin name)	ELISA test	Seroneutralization test (+ sera with cell toxicity)	Number with ticks		
PASSERINES	YES	<b>Willow Warbler</b>	<i>Phylloscopus trochilus</i>	-	<b>3/89</b> (+7)	<b>1</b>		
		<b>Common Redstart</b>	<i>Phoenicurus phoenicurus</i>	-	<b>1/45</b> (+5)	<b>1</b>		
		Common Nightingale	<i>Luscinia megarhynchos</i>	-	0/26 (+1)	2		
		<b>Pied Flycatcher</b>	<i>Ficedula hypoleuca</i>	-	<b>1/24</b> (+3)	<b>2</b>		
		Garden Warbler	<i>Sylvia borin</i>	-	0/23 (+1)	-		
		<b>Whitethroat</b>	<i>Sylvia communis</i>	-	<b>3/16</b>	-		
		Spotted Flycatcher	<i>Muscicapa striata</i>	-	0/11	-		
		<b>Woodchat Shrike</b>	<i>Lanius senator</i>	-	<b>1/6</b> (+1)	-		
		Melodious Warbler	<i>Hippolais polyglotta</i>	-	0/3 (+1)	-		
		Wood Warbler	<i>Phylloscopus sibilatrix</i>	-	0/2	-		
		Barn Swallow	<i>Hirundo rustica</i>	0/2	0/1	-		
		Reed Warbler	<i>Acrocephalus scirpaceus</i>	-	0/2	-		
		Great Reed Warbler	<i>Acrocephalus arundinaceus</i>	-	0/1	-		
		Tawny Pipit	<i>Anthus campestris</i>	-	0/1	-		
		Wheatear	<i>Oenanthe oenanthe</i>	-	0/1	-		
		POSSIBLY		<b>Blackcap</b>	<i>Sylvia atricapilla</i>	-	<b>1/73</b> (+12)	<b>1</b>
				Chiffchaff	<i>Phylloscopus collybita</i>	0/21	0/8	-
				Yellow Wagtail	<i>Motacilla flava</i>	-	0/2	-
		NON	NO	Eurasian Robin	<i>Erithacus rubecula</i>	0/55	0/33 (+5)	4
House Sparrow	<i>Passer domesticus</i>			0/9	0/3 (+1)	-		
Subalpine Warbler	<i>Sylvia cantillans</i>			-	0/5	-		
Black Redstart	<i>Phoenicurus ochruros</i>			-	0/5 (+1)	-		
Sardinian Warbler	<i>Sylvia melanocephala</i>			-	0/2	-		
Tree Sparrow	<i>Passer montanus</i>			0/4	0/1	-		
Dunnock	<i>Prunella modularis</i>			-	0/1 (+1)	-		
Reed Bunting	<i>Emberiza schoeniclus</i>			-	0/1	-		
European Blackbird	<i>Turdus merula</i>			-	0/1	-		
Chaffinch	<i>Fringilla coelebs</i>			-	0/1	-		
Wren	<i>Troglodytes troglodytes</i>			-	0/1	-		
NON PASSERINES	YES			<b>Hoopoe</b>	<i>Upupa epops</i>	-	<b>1/3</b>	-
				Common Cuckoo	<i>Cuculus canorus</i>	-	0/1	-
	POSSIBLY	Wryneck	<i>Jynx torquilla</i>	-	0/1	-		
<b>TOTAL</b>				0/91	11/393 (+39)	11		

**Séroprévalence et isolement viral chez les  
oiseaux sédentaires en période épizootique,  
phylogénie sur génome complet**

---

***Article 4***

---

Article en révision

*Revue : Vector Borne and Zoonotic Diseases*

***West Nile virus in wild resident birds,  
southern France, 2004***





## West Nile virus in wild resident birds, southern France, 2004

E Jourdain<sup>1,2,3</sup>, I Schuffenecker<sup>1</sup>, J Korimbocus<sup>1</sup>, S Reynard<sup>1</sup>, S Murri<sup>1</sup>, Y Kayser<sup>2</sup>, M Gauthier-Clerc<sup>2</sup>, P Sabatier<sup>3</sup>, H Zeller<sup>1</sup>,

1 – National Reference Center for Arboviruses, Institut Pasteur, 21 avenue Tony Garnier, F-69365 Lyon cedex 07, France

2 – Station Biologique de La Tour du Valat, Le Sambuc, F-13200 Arles, France

3 – Unité EPSP-TIMC, UMR 55-25, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon – Institut National de Recherche Agronomique, 1 avenue Bourgelat, F-69280 Marcy l'Etoile, France

### Running title

West Nile virus in wild resident birds

### Key words

West Nile virus, wild birds, France, complete genome

### Word count

Abstract: 101

Text: 983

### Abstract

An equine West Nile virus (WNV) outbreak occurred in 2004 in the Camargue, a wetland area in the south of France where the virus was first reported in 1962 and reemerged in 2000. WNV neutralizing antibodies were detected in resident birds and two isolates from a House Sparrow (*Passer domesticus*) and a Common Magpie (*Pica pica*) were completely sequenced. Phylogenetic analyses revealed that these isolates are closely related to strains previously found in horses in southern Europe and North Africa. To our knowledge, it is the first time that WNV avian isolates from the western Mediterranean basin have been entirely sequenced.

First reported in southern France in the Camargue region in 1962, West Nile virus (WNV) reemerged in this area in 2000 causing 76 equine confirmed cases (Murgue et al. 2001). Surveillance of sentinel birds then revealed a low circulation of WNV in 2001 and 2002 whereas no seroconversion was reported in the area in 2003. In late July 2004, WNV circulation was detected by the seroconversion of a sentinel chicken close to Les-Saintes-Maries-de-la-Mer (Zeller et al. 2004). On September 6, 7 out of 12 sentinel birds from this flock were positive for WNV antibodies. Between August 28 and October 14, 32 WNV equine cases were confirmed (Zeller et al. 2004). As wild synanthropic birds had been suspected to act as WNV amplifying hosts during the 2000 epizootic, we decided to study the circulation of WNV among three wild resident bird species which live close to horse farms, *i.e.* the Common Magpie (*Pica pica*), the House Sparrow (*Passer domesticus*) and the Tree Sparrow (*Passer montanus*). We report the results of this serosurvey and the complete genome sequence and phylogenetic relationships of two WNV isolates from a house sparrow and a magpie.

The study was conducted in the Camargue delta, a wetland region near the Mediterranean coast which corresponds to the delta of the Rhône river. Wild birds were captured using mist nets or traps from August to October 2004 in two main sites: the Tour du Valat Estate (site A) and the Marais du Vigueirat (site B). A few magpies were also sampled near Les Saintes-Maries de la Mer (site C) (Figure 1). All birds were tagged and bled from the brachial vein before being released. A total of 144, 52 and 32 samples were collected from house sparrows, tree sparrows and magpies respectively.

Sera were screened for WNV immunoglobulin G (IgG) using an in-house indirect ELISA method (Murgue et al. 2001) with a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-wild bird IgG (A140-110P, Bethyl Laboratories, Montgomery, TX). Positive samples were confirmed by a microneutralization assay adapted from Malkinson et al. (2002) using the France 05.21/00 WNV equine strain (accession no. AY268132) and crystal violet staining. WNV neutralizing antibodies were detected in five asymptomatic birds (one house sparrow and four yearling magpies), revealing a recent circulation of WNV in the local bird population (Table 1). In addition, WNV specific antibodies were detected in another house sparrow found dying on October 18 in site A and that was exhibiting torticollis and tremors.

Brain samples of the dead sparrow collected in site A and a dead magpie collected on October 21 in site C tested positive by RT-PCR (Lanciotti et al. 2000) and WNV was isolated from both birds on C6/36 cells (Schuffenecker et al. 2005). The complete genome of both isolates were sequenced (after the first passage for the sparrow isolate, France 405/04, accession no. DQ786572 and after the second passage for the magpie isolate, France 407/04, accession no. DQ786573). Pairwise alignments of both genomes using ClustalW1.7 software showed 100% nucleotide identity, suggesting that both birds were infected with a single

WNV strain. To our knowledge, these are the first WNV avian isolates in western Europe that were completely sequenced.

Multiple alignment of our sequences with other WNV sequences available in GenBank database were generated by ClustalW1.7 software. Both sequences were related to WNV lineage 1 strains belonging to the clade 1a. Based on complete genome sequences, they were closer to strains from the European/Mediterranean/Kenyan cluster (98.1-99.0% nucleotide identity) than to those from the Israeli/American cluster (95.9-96.2% nucleotide identity). Eight amino acid substitutions distinguished our sequences from other WNV clade 1a lineage 1 sequences (Table 2). A phylogenetic tree (Figure 2) based on complete genome sequences was constructed with Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software (version 2.1), using the neighbor-joining method and Kimura 2-parameter distance matrixes (with gamma correction) (Kumar et al. 2001). The robustness of branching patterns was tested by 1,000 bootstrap pseudoreplications.

Our serological and virological data, combined with serosurveillance data based on captive sentinel birds (Zeller et al. 2004), indicate that WNV circulated among birds in the Camargue region before and during the 2004 equine outbreak and that both avian WNV isolates are closely related to those previously found in horses in southern Europe and North Africa. Although no WNV strain could be isolated from the brain biopsies sampled from horses in 2004, it is probable that our WNV avian strain was the one involved in the equine outbreak. Indeed, WNV is believed to be transmitted to horses by mosquitoes able to feed both on birds and mammals. Non dispersive mosquito species, e.g. *Culex* species suspected to act as epidemic vectors in the Camargue (Balenghien et al. 2006), are likely to get infected while feeding on birds and to subsequently transmit the virus to horses. As sparrows and magpies are closely associated with human settlements and farming activities, they appear to be ideal avian hosts for WNV amplification and transmission to horses.

No unusual bird mortality was observed during the French 2004 equine outbreak and, more generally, during WNV equine and human outbreaks in Europe (Dauphin et al. 2004). A low WNV associated mortality level might however stay undetected because of the small bird size and the presence of scavengers (Wobeser and Wobeser 1992). Experimental infection using European birds would be useful to help assess the mortality rate associated with WNV infection in free-ranging European bird species.

Since the isolated strain is closely related to other WNV strains belonging to the European/Mediterranean/Kenyan cluster, there might be a dissemination of WNV between the Camargue and other geographical areas in Europe and Africa. Migratory birds, in particular, are believed to be able to introduce WNV in the Camargue, either in autumn from western Europe or in spring from West and North Africa (Jourdain et al. 2007). The endemicity of

WNV in the Camargue is also questionable and further investigations on resident birds are required during inter-epizootic periods.

### Acknowledgments

This study was supported by the CNES (French National Center for Spatial Studies) and the INRA (French National Institute for Research in Agronomy). Special thanks to the persons who helped doing the field work (C. Arzel, F. Bosca, J. Guillemont, A. Arnaud, O. Pineau). We also thank G. Massez from the Marais du Vigueirat and B. Mazel who allowed us to catch birds on their respective ground.

### References

- Balenghien, T, Fouque, F, Sabatier, P, Bicout, DJ. Horse, bird and human-seeking behavior and seasonal abundance of mosquitoes in a West Nile focus of southern France. *J Med Entomol* 2006; 43: 936-946.
- Dauphin, G, Zientara, S, Zeller, H, Murgue, B. West Nile: worldwide current situation in animals and humans. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004; 27: 343-355.
- Jourdain, E, Toussaint, Y, Leblond, A, Bicout, DJ et al. Bird species potentially involved in introduction, amplification and spread of West Nile virus in a Mediterranean wetland, the Camargue (southern France). *Vector Borne Zoonotic Dis* 2007; *in press*.
- Kumar, S, Tamura, K, Jakobsen, IB, Nei, M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 2001; 17: 1244-1245.
- Lanciotti, RS, Kerst, AJ, Nasci, RS, Godsey, MS et al. 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* 2000; 38: 4066-4071.
- Malkinson, M, Banet, C, Weisman, Y, Pokamunski, S et al. Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 392-397.
- Murgue, B, Murri, S, Zientara, S, Durand, B et al. West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 692-696.
- Schuffenecker, I, Peyrefitte, CN, el Harrak, M, Murri, S et al. West Nile virus in Morocco, 2003. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 306-309.
- Wobeser, G, Wobeser, AG. Carcass disappearance and estimation of mortality in a simulated die-off of small birds. *J Wild Dis* 1992; 28: 548-554.
- Zeller, H, Zientara, S, Hars, J, Languille, J et al. West Nile outbreak in horses in Southern France: September 2004. *Eurosurveillance Weekly*; 2004, 8. Available at <http://www.eurosurveillance.org/ew/2004/041007.asp>.

**Table 1**

Results of the serological survey performed on asymptomatic sparrows and magpies between mid August and mid October 2004. Confidence intervals were calculated for a 5% error risk using the Binomial law.

Species	Capture site	Number tested	Number positive	Seroprevalence (%)
<b>Sparrows</b> ( <i>Passer domesticus</i> , <i>Passer montanus</i> )	A	97	1	1.0 [0.0-5.6]
	B	99	0	0.0 [0.0-3.6]
	<b>Total</b>	<b>196</b>	<b>1</b>	<b>0.5 [0.0-2.8]</b>
<b>Magpies</b> ( <i>Pica pica</i> )	A	23	1	4.3 [0.1-22.0]
	B	5	0	0.0 [0.0-52.2]
	C	4	3	75.0 [19.4-99.4]
	<b>Total</b>	<b>32</b>	<b>4</b>	<b>12.5 [3.5-29.0]</b>

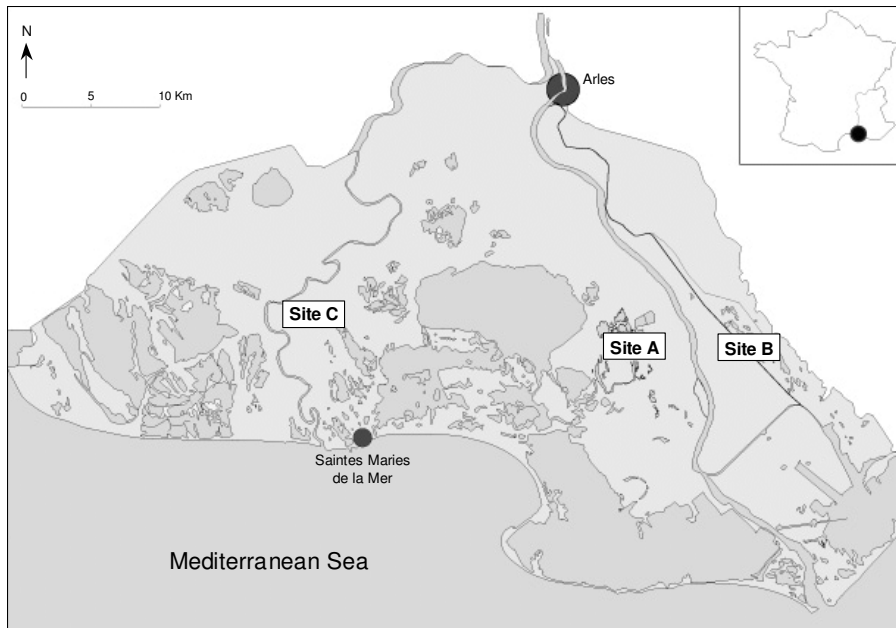
**Table 2**

Amino-acid differences observed between WNV France 2004 isolates and other WNV clade 1a lineage 1 genomes.

Protein	Amino-acid position	WNV France 2004 isolates	Other WNV clade 1a lineage 1 genomes
Capsid	100	Leu	Ser
Capsid	119	Thr	Ala
Pre-M	35	Thr	Ile
Envelope	153	Arg	Gly
Envelope	312	Phe	Leu
NS1	138	Ser	Pro
NS1	141	Arg	Lys
NS5	374	His	Tyr

**Figure 1.**

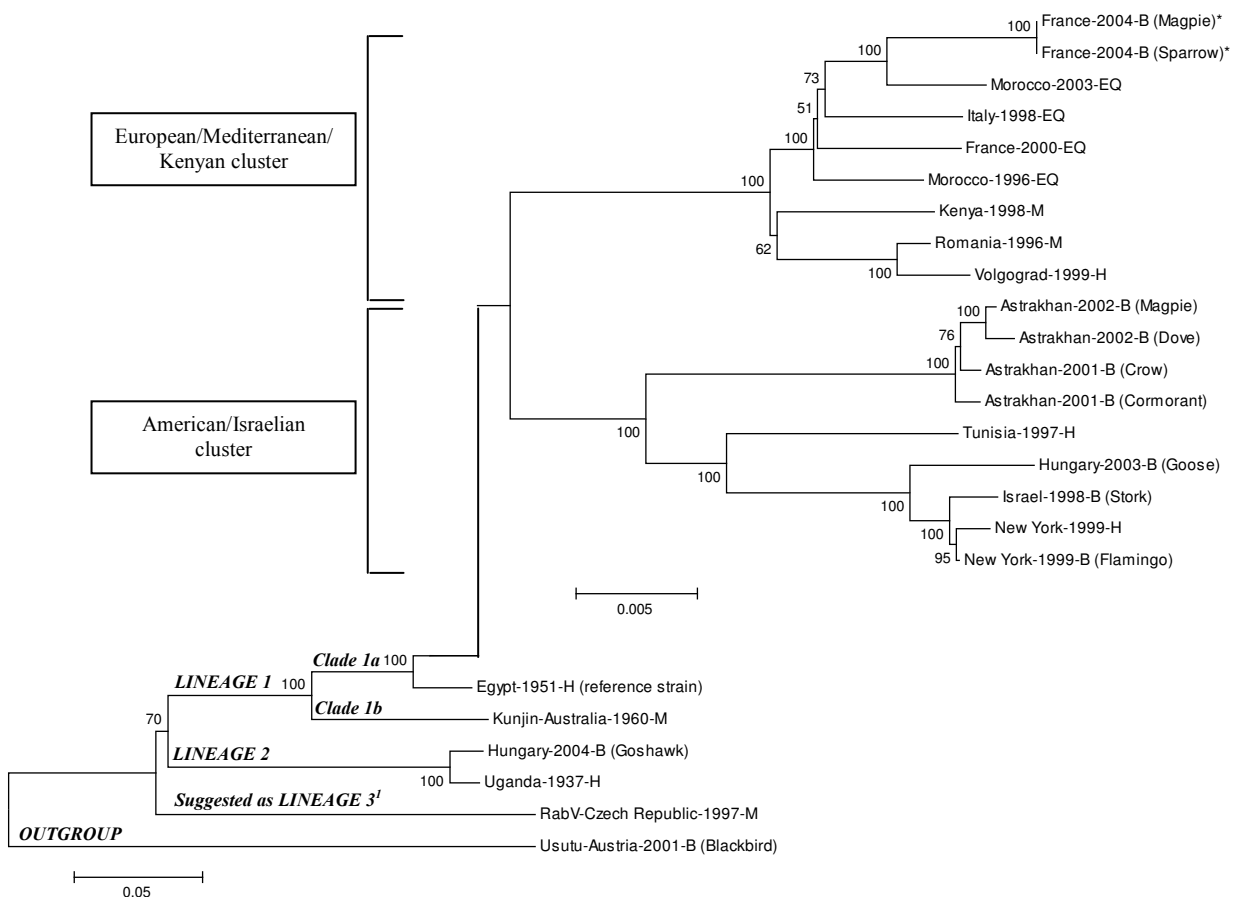
Map of the Camargue area with localization of the study sites.



## Figure 2

Phylogenetic tree of West Nile Virus (WNV) complete nucleotide sequences (10714 nucleotides) constructed with the MEGA program, by using the Kimura 2 algorithm and the neighbor-joining method. The percentage of successful bootstrap replicates is indicated at nodes. The length of branches is proportional to the number of nucleotide changes (percentage of divergence). The strains sequenced in this study are indicated by asterisks (\*). EQ = equine, H = human, M = mosquito, B = bird. Please note the change of scale between right and left sections.

GenBank accession no.: Morocco 2003 (AY701413), Italy 1998 (AF404757), France 2000 (AY268132), Morocco 1996 (AY701412), Kenya 1998 (AY262283), Romania 1996 (AF260969), Volgograd 1999 (AF317203), Astrakhan 2002 Magpie (DQ374651), Astrakhan 2002 Dove (DQ411032), Astrakhan 2001 Crow (DQ411031), Astrakhan 2001 Cormorant (DQ411029), Tunisia 1997 (AY268133), Hungary 2003 (DQ118127), Israel 1998 Stork (AF481864), NY 1999 Human (AF202541), NY 1999 Flamingo (AF196835), Egypt 1951 (AF260968), Kunjin 1960 (D00246), Hungary 2004 (DQ116961), Uganda 1937 (M12294), RabV Czech Republic 1997 (AY765264), Usutu Austria 2001 (NC\_006551).



<sup>1</sup> Bakonyi T., Hubálek Z., Rudolf R., Nowotny N. Novel Flavivirus or New Lineage of West Nile Virus, Central Europe. *Emerg. Inf. Dis.* 2005, 11, 2, 225-231.





---

# ***ANNEXES***

---



## ANNEXE 1

## Méthodes de suivi de l'avifaune utilisées en Camargue

Famille	Genre	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
GAVIIDAE	<i>Gavia</i>	x	x	x	x							x			
PODICIPEDIDAE	<i>Tachybaptus</i>	x	x	x	x							x			
	<i>Podiceps</i>	x	x	x	x							x			
PROCELLARIIDAE	<i>Calonectris</i>														
	<i>Puffinus</i>														
HYDROBATIDAE	<i>Hydrobates</i>														
SULIDAE	<i>Morus</i>														
PHALACROCORACIDAE	<i>Phalacrocorax</i>	x	x	x	x	x									
ARDEIDAE	<i>Botaurus</i>	x	x	x								x			[1, 2]
	<i>Ixobrychus</i>	x	x	x								x			[3]
	<i>Ardeola, Nycticorax, Egretta, Ardea, Bubulcus</i>	x	x	x	x	x		x	x						[4, 5, 6, 7]
	<i>Ciconia</i>	x	x	x	x										
CICONIIDAE	<i>Ciconia</i>	x	x	x	x										
	<i>Plegadis, Threskiornis</i>	x	x	x	x	x		x							
THRESKIORNITHIDAE	<i>Platalea</i>	x	x	x	x			x	x	x					
PHOENICOPTERIDAE	<i>Phoenicopterus</i>	x	x	x	x		x	x							
ANATIDAE	<i>Cygnus olor</i>	x	x	x	x		x		x						
	<i>Anser</i>	x	x	x	x		x								
	<i>Tadorna, Anas</i>	x	x	x	x		x					x			
	<i>Netta</i>	x	x	x	x		x								[8]
	<i>Aythya</i>	x	x	x	x		x								
	<i>Somateria, Clangula, Melanitta</i>	x	x	x	x										
	<i>Bucephala, Mergus</i>	x	x	x	x										
ACCIPITRIDAE	<i>Pernis, Milvus, Neophron</i>	x	x	x	x					x		x			
	<i>Circaetus, Circus, Accipiter, Buteo</i>	x	x	x	x						x	x			
	<i>Aquila, Hieraaetus</i>	x	x	x	x						x				
PANDIONIDAE	<i>Pandion</i>	x	x	x	x						x				
FALCONIDAE	<i>Falco</i>	x	x	x	x						x	x			
PHASIANIDAE	<i>Alectoris, Coturnix, Phasianus</i>	x	x	x	x							x			
RALLIDAE	<i>Rallus, Gallinula</i>	x	x	x	x							x			
	<i>Crex, Porzana</i>	x	x	x	x										
	<i>Fulica</i>	x	x	x	x		x					x			
GRUIDAE	<i>Grus</i>	x	x	x	x		x								
HAEMATOPODIDAE	<i>Haematopus</i>	x	x	x	x										
RECURVIROSTRIDAE	<i>Himantopus</i>	x	x	x	x										
	<i>Recurvirostra</i>	x	x	x	x										
BURHINIDAE	<i>Burhinus</i>	x										x			
GLAREOLIDAE	<i>Glareola</i>	x	x	x	x										[9]
CHARADRIIDAE	<i>Charadrius, Pluvialis, Vanellus, Xenus</i>	x	x	x	x										
SCOLOPACIDAE	<i>Limosa</i>	x	x	x	x		x								
	<i>Scolopax</i>	x											x		
	<i>Calidris, Limicola</i>	x	x	x	x										
	<i>Gallinago, Lymnocyptes</i>	x	x	x	x									x	
	<i>Tringa, Actitis, Philomachus, Phalaropus</i>	x	x	x	x										
	<i>Numenius, Phalaropus, Arenaria</i>	x	x	x	x		x								
STERCORARIIDAE	<i>Catharacta, Stercorarius</i>	x	x	x	x										
LARIDAE	<i>Larus, Sterna, Gelocheidon, Chlidonias</i>	x	x	x	x	x		x							[10]
ALCIDAE	<i>Alca, Fratercula</i>														
PTEROCLIDIDAE	<i>Pterocles</i>	x													
COLUMBIDAE	<i>Streptopelia, Columba</i>	x										x			
CUCULIDAE	<i>Cuculus, Clamator</i>	x										x			
STRIGIDAE	<i>Tyto, Otus, Asio, Bubo, Strix, Athene</i>	x										x			
CAPRIMULGIDAE	<i>Caprimulgus</i>	x										x			
APODIDAE	<i>Apus</i>	x													
ALCEDINIDAE	<i>Alcedo</i>	x													
MEROPIIDAE	<i>Merops</i>	x													[11]
CORACIIDAE	<i>Coracias garrulus</i>	x										x			

Famille	Genre	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
UPUPIDAE	<i>Upupa epops</i>	x										x			
PICIDAE	<i>Jynx torquilla</i>	x										x			
	<i>Picus, dendrocops</i>	x										x			[12]
ALAUDIDAE	<i>Galerida, Lullula, Alauda, Calandrella, Melanocorypha</i>	x								x	x	x	x	x	
HIRUNDINIDAE	<i>Riparia, Hirundo, Delichon</i>	x								x	x	x	x	x	[13]
MOTACILLIDAE	<i>Anthus, Motacilla</i>	x								x	x	x	x	x	
CINCLIDAE	<i>Cinclus</i>	x								x	x	x	x	x	
TROGLODYTIDAE	<i>Troglodytes</i>	x								x	x	x	x	x	
PRUNELLIDAE	<i>Prunella</i>	x								x	x	x	x	x	
TURDIDAE	<i>Oenanthe, Saxicola, Phoenicurus</i>	x								x	x	x	x	x	
	<i>Erithacus, Turdus, Monticola</i>	x								x	x	x	x	x	
	<i>Luscinia</i>	x								x	x	x	x	x	[14]
SYLVIIDAE	<i>Acrocephalus</i>	x								x	x	x	x	x	[15]
	<i>Regulus</i>	x								x	x	x	x	x	
	<i>Phylloscopus, Hippolais</i>	x								x	x	x	x	x	
	<i>Locustella, Cisticola</i>	x								x	x	x	x	x	
	<i>Sylvia, Cettia</i>	x								x	x	x	x	x	
MUSCICAPIDAE	<i>Ficedula</i>	x								x	x	x	x	x	
	<i>Muscicapa</i>	x								x	x	x	x	x	
TIMALIIDAE	<i>Panurus</i>	x								x	x	x	x	x	
AEGITHALIDAE	<i>Aegithalos</i>	x								x	x	x	x	x	
PARIDAE	<i>Parus</i>	x								x	x	x	x	x	
SITTIDAE	<i>Sitta</i>	x								x	x	x	x	x	
TICHODROMADIDAE	<i>Tichodroma</i>	x								x	x	x	x	x	
CERTHIIDAE	<i>Certhia</i>	x								x	x	x	x	x	
REMIZIDAE	<i>Remiz</i>	x								x	x	x	x	x	
ORIOIIDAE	<i>Oriolus</i>	x								x	x	x	x	x	
LANIIDAE	<i>Lanius</i>	x								x	x	x	x	x	
CORVIDAE	<i>Pica, Corvus</i>	x								x	x	x	x	x	[16]
	<i>Garrulus</i>	x								x	x	x	x	x	
STURNIDAE	<i>Sturnus</i>	x								x	x	x	x	x	
PASSERIDAE	<i>Montifringilla, Petronia</i>	x								x	x	x	x	x	
	<i>Passer</i>	x								x	x	x	x	x	
FRINGILLIDAE	<i>Carduelis, Serinus</i>	x								x	x	x	x	x	
	<i>Fringilla, Coccothraustes</i>	x								x	x	x	x	x	
	<i>Pyrrhula pyrrhula</i>	x								x	x	x	x	x	
	<i>Loxia curvirostra</i>	x								x	x	x	x	x	
EMBERIZIDAE	<i>Miliaria, Plectrophenax, Emberiza</i>	x								x	x	x	x	x	

- A. Réseau d'ornithologues : base de données Camargue
- B. Comptages mensuels des zones protégées (toute l'année)
- C. Comptage d'oiseaux d'eau organisé par *Wetlands International* à la mi-janvier (toute la Camargue : par avion et au sol)
- D. Comptage hebdomadaire sur le domaine de la Tour du Valat
- E. Comptage des dortoirs pendant l'hiver par un réseau d'ornithologues
- F. Comptage hivernal mensuel des zones de repos de septembre à mars par un réseau d'ornithologues
- G. Localisation des colonies par avion et comptage au sol par des ornithologues de la Tour du Valat au printemps
- H. Comptage des nids par avion
- I. Estimation du nombre de reproducteurs sur 2500 hectares (tous les cinq ans, sur le domaine de la Tour du Valat)
- J. Comptage hebdomadaire par Jacques Blondel pendant trois ans (contact visuel et chants) sur un même transect
- K. Extrapolation en période de reproduction
- L. Extrapolation en période de migration et d'hivernage
- M. Capture au filet japonais pendant la migration dans les années 1950 à 1975 et depuis 2004
- N. Etudes spécifiques :
- 1 Poulain B and Lefebvre G. Optimal sampling of booming Bitterns *Botaurus stellaris*. *Ornis Fennica*. 2003;80:11-20.
  - 2 Kayser Y, Hafner H, Massez G. Dénombrement des mâles chanteurs de butors étoilés *Botaurus stellaris* en Camargue en 1996. *Alauda*. 1998;66:97-102.

- 3 Kayser Y, Marion L, Duhautois L. Blongios nain *Ixobrychus minutus*. In: Oiseaux menacés et à surveiller en France. Listes rouges et recherche de priorités. Populations. Tendances. Menaces. Conservation. Rocamora and Yeatman-Berthelot, editors. SEOF LPO Paris, France. 1999. p.54.
- 4 Tourenq C, Bennetts RE, Sadoul N, Mesléard F, Kayser Y, Hafner H. Long-term population and colony patterns of four species of tree-nesting herons in the Camargue, South France. *Waterbirds*. 2000;23:147-156.
- 5 Barbraud C, Kayser Y, Cohez D, Gauthier-Clerc M, Hafner H. Detection probability of nests of Squacco Herons in southern France. *Journal of Field Ornithology*. 2004;75(2):172-175.
- 6 Kayser Y, Walmsley J, Pineau O, Hafner H. Evolution récente des effectifs de Hérons cendrés (*Ardea cinerea*) et de Hérons pourprés (*Ardea purpurea*) nicheurs sur le littoral méditerranéen français. *Nos Oiseaux* 42: 341-355.
- 7 Hafner H, Pineau O, Wallace JP. The effects of winter climate on the size of the Cattle Egret (*Bubulcus ibis* L.) population in the Camargue. *Rev. Ecol (Terre et Vie)*. 1992;47:403-410.
- 8 Defos Du Rau P, Barbraud C, Mondain-Monval JY. Estimating breeding population size of the red-crested pochard (*Netta rufina*) in the Camargue (southern France) taking into account detection probability: implications for conservation. *Anim Conserv*. 2003;6:379-385.
- 9 Vincent-Martin N. Reproduction des glaréoles à collier pour l'année 2000. *Feuille Naturaliste CEEP*. 2000;56:34.
- 10 Sadoul N. The importance of spatial scales in long-term monitoring of colonial Charadriiformes in Southern France Colon. *Waterbird*. 1997;20:330-338.
- 11 Localisation des colonies par un réseau d'ornithologues
- 12 Estimation spécifique du nombre de reproducteurs en Camargue
- 13 Estimation spécifique du nombre de reproducteurs en Camargue
- 14 Poulin B, Lefebvre G, Metref S. Spatial distribution of nesting and foraging sites of two *Acrocephalus* warblers in a Mediterranean reedbed. *Acta Ornithol*. 2000;35:117-121.
- 15 Poulin B, Lefebvre G, Pilard P. Quantifying the breeding assemblage of reedbed passerines with mist-net and point-count surveys. *J Field Ornithol*. 2000;71:443-454.
- 16 Bardot P. Occupation de l'espace par la Pie bavarde (*Pica pica*) et la Corneille noire (*Corvus corone*) et leur reproduction en zones humides : l'exemple des marais du Vigueirat, en Camargue. Mémoire de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes. Laboratoire de Biogéographie et Ecologie des Vertébrés. Université Montpellier II, Montpellier; 2001: 134.

## ANNEXE 2

### Sérologie par technique ELISA indirect – Protocole –

#### Réactifs et produits

- Anticorps (Ac) couplé à la peroxydase anti-oiseaux (Béthly réf A140-110P)
- Antigène (Ag) West Nile et antigène négatif en borate triton 1% (CNR arbovirus)
- PBS-azide (CNR arbovirus)
- PBS-tween (CNR arbovirus)
- Lait en poudre (Difco réf 0032-17-3)
- TMB peroxydase et peroxydase solution (KPL réf 50-76-00)
- H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10,6% (CNR arbovirus)

#### Matériel

- Incubateur sec +37 °C pour plaque ELISA
- Lecteur de densité optique pour plaque ELISA
- Plaques Polysorb Nunc-Immuno Plate (Polylabo réf 13382)
- Réfrigérateur à +4 °C

#### Protocole

- La veille, diluer l'Ag West Nile et l'Ag négatif au 1/1000<sup>ème</sup> dans du PBS azide puis distribuer les Ag à raison de 100 µL par puits. L'Ag WN est distribué par colonne, en alternance avec l'Ag négatif.  
Remarque : l'Ag négatif est un Ag réalisé à partir de cellules non infectées (respectant les mêmes conditions que celles correspondant à l'Ag WN). Il permet d'évaluer le signal non spécifique de chaque échantillon.
- Envelopper les plaques dans du papier aluminium. Incuber une nuit à +4 °C au réfrigérateur (dans ces conditions, les plaques peuvent être conservées une semaine).
- Reconstituer le diluant : 6g de lait en poudre dans 200 mL de PBS-Tween soit PBS-Tween-lait à 3%.
- Diluer les échantillons, ainsi que quatre sérums témoins (un positif et trois négatifs), au 1/100<sup>ème</sup> dans du PBS-Tween-lait.
- Laver 1 fois en PBS-Tween puis à l'eau les plaques coatées la veille.
- Distribuer 100 µL des sérums dilués dans les puits coatés par les Ag WN et Ag négatif.
- Incuber 1 heure à +37 °C dans l'incubateur à sec pour plaque ELISA
- Laver 3 fois en PBS-Tween puis à l'eau
- Diluer l'anticorps anti-oiseaux couplé à la peroxydase au 1/4000<sup>ème</sup> dans du PBS-Tween-lait
- Distribuer 100 µL par puits

- Incuber 1 heure à +37 °C dans l'incubateur à sec pour plaque ELISA
- Laver 3 fois en PBS-Tween puis à l'eau
- Préparer extemporanément le substrat pour la peroxydase (1 volume de TMB peroxydase et 1 volume de peroxydase solution)
- Distribuer 100 µL par puits
- Incuber 10 minutes à température ambiante
- Arrêter la réaction avec 100 µL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> à 10,6%

### Résultats

- Lire la densité optique (DO) à 450 et 650 nm

Les valeurs des DO obtenues sur les sérums témoins tiennent lieu de premier contrôle. Si les DO obtenues sur les témoins négatifs sont inférieures à 0,200, le bruit de fond est considéré comme correct. La DO obtenue sur le témoin positif doit être supérieure à 0,500.

Les valeurs de DO obtenues sur l'antigène négatif doivent être inférieures à 0,200.

Par sérum, la DO obtenue sur l'Ag WN est retranchée de la DO obtenue sur l'Ag négatif.



## ANNEXE 3

### Sérologie par technique ELISA par compétition

– Protocole (non validé) –

#### Réactifs et produits

- Anticorps monoclonal 3.1112G (Chemicon réf mab 8152)
- Anticorps (Ac) couplé à la peroxydase anti-IgM de souris (Sigma réf A8786)
- Antigène (Ag) West Nile et antigène négatif en borate triton 1% (CNR arbovirus)
- PBS-azide (CNR arbovirus)
- PBS-tween (CNR arbovirus)
- Lait en poudre (Difco réf 0032-17-3)
- TMB peroxydase et peroxydase solution (KPL réf 50-76-00)
- H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10,6% (CNR arbovirus)

#### Matériel

- Incubateur sec +37 °C pour plaque ELISA
- Lecteur de densité optique pour plaque ELISA
- Plaques Polysorb Nunc-Immuno Plate (Polylabo réf 13382)
- Réfrigérateur à +4 °C

#### Protocole

- La veille, diluer l'Ag West Nile et l'Ag négatif au 1/1000<sup>ème</sup> dans du PBS azide puis distribuer les Ag à raison de 100 µL par puits. L'Ag WN est distribué par colonne, en alternance avec l'Ag négatif.  
Remarque : l'Ag négatif est un Ag réalisé à partir de cellules non infectées (respectant les mêmes conditions que celles correspondant à l'Ag WN. Il permet d'évaluer le signal non spécifique de chaque échantillon.
- Envelopper les plaques dans du papier aluminium. Incuber une nuit à +4 °C au réfrigérateur (dans ces conditions, les plaques peuvent être conservées une semaine).
- Reconstituer le diluant : 6g de lait en poudre dans 200 mL de PBS-Tween soit PBS-Tween-lait à 3%.
- Diluer les échantillons, ainsi que huit sérums témoins (deux positifs et six négatifs), au 1/10<sup>ème</sup> dans du PBS-Tween-lait.
- Laver 1 fois en PBS-Tween puis à l'eau les plaques coatées la veille.
- Distribuer 100 µL des sérums dilués dans les puits coatés par les Ag WN et Ag négatif.
- Incuber 2 heures à +37 °C dans l'incubateur à sec pour plaque ELISA
- Laver 3 fois en PBS-Tween puis à l'eau

- Diluer l'anticorps monoclonal 3.1112G au 1/10000<sup>ème</sup> dans du PBS-Tween-lait
- Distribuer 100 µL par puits
- Incuber 1 heure 30 à +37 °C dans l'incubateur à sec pour plaque ELISA
- Diluer l'anticorps anti-souris couplé à la peroxydase au 1/1000<sup>ème</sup> dans du PBS-Tween-lait
- Distribuer 100 µL par puits
- Incuber 1 heure 30 à +37 °C dans l'incubateur à sec pour plaque ELISA
- Laver 3 fois en PBS-Tween puis à l'eau
- Préparer extemporanément le substrat pour la peroxydase (1 volume de TMB peroxydase et 1 volume de peroxydase solution)
- Distribuer 100 µL par puits
- Incuber 10 minutes à température ambiante
- Arrêter la réaction avec 100 µL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> à 10,6%

### Résultats

- Lire la densité optique (DO) à 450 et 650 nm

Par sérum, la DO obtenue sur l'Ag WN est retranchée de la DO obtenue sur l'Ag négatif. Le pourcentage d'inhibition est calculé comme suit :

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

Où S : DO du sérum testé, BF : bruit de fond correspondant,

ST<sub>i</sub> : DO des sérums témoins, BF<sub>i</sub> : bruit de fond des sérums témoins

Un sérum est supposé positif pour un pourcentage d'inhibition supérieur à 45%.

## ANNEXE 4

### Sérologie par neutralisation en plaque 96 puits

– Protocole –

*Pour 9 plaques de séroneutralisation et 1 plaque de titrage*

#### Réactifs et produits

- Virus West Nile 05/21-3 de titre  $5.10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL (CNR arbovirus)
- Cellules Vero E6 CRL-1586 (MO RH 00013)
- DMEM Milieu Eagle Modifié Dulbecco
- SVF Sérum de Veau Fœtal (MO RH 00015)
- ATB Antibiotiques (MO RH 00015)
- Trypsine Versène (MO RH 00010)
- Crystal violet
- Eau
- Glace

#### Matériel

En P3 :

- Hotte à flux laminaire
- Bain marie 56 °C
- Incubateur 37 °C sous 5% CO<sub>2</sub>
- Congélateur -80 °C
- Réfrigérateur +4 °C
- Plaques stériles 96 puits à fond plat

En pièce propre :

- Hotte à flux laminaire
- Incubateur 37 °C sous 5% CO<sub>2</sub>
- Centrifugeuse
- Microscope inversé
- Réfrigérateur +4 °C

#### Protocole

*Jour J-3 : en pièce propre*

- Préparer les cellules nécessaires pour la manipulation (50 millions si 9 plaques de séroneutralisation)

*Jour J : en P3*

- Allumer le bain-marie (56 °C)
- Diluer les sérums au  $1/10^{\text{ème}}$  dans du milieu (=DMEM+SVF+ATB) : 35 µL dans 315 µL
- Incuber les sérums dilués pendant 30 minutes à 56 °C
- Identifier les plaques :
  - Plaques de séroneutralisation : indiquer pour chaque colonne le numéro du sérum testé (deux colonnes par sérum car ils sont testés en duplicate)
  - Plaque de titrage : indiquer pour chaque colonne le titre viral ( $10^{-2}$  à  $10^{-9}$  pour les colonnes 1 à 8,  $4.10^{-5}$  (soit 100 TCID<sub>50</sub>) en colonne 9 et témoin cellule en colonne 12)

- Distribuer le milieu dans les plaques de séroneutralisation : 50  $\mu\text{L}$  par puits pour A1-A12 (témoins cellules) et pour C1-C12 à H1-H12
  - Distribuer le milieu dans la plaque de titrage : 50  $\mu\text{L}$  par puits en colonne 9 (dilution du virus utilisée pour les plaques de sérum) et 100  $\mu\text{L}$  par puits en colonne 12 (témoin cellule)
  - Distribuer les sérums dilués en ligne B : 150  $\mu\text{L}$ /puits (en duplicate)
  - Prendre 50  $\mu\text{L}$  des sérums dilués en ligne B et les ajouter aux 50  $\mu\text{L}$  de milieu de la ligne A (témoin cellule)
  - Diluer les sérums de 2 en 2 : 50  $\mu\text{L}$  de B vers C, puis de C vers D, puis de D vers E, etc...
- Les plaques ainsi préparées peuvent être conservées au réfrigérateur pendant une à deux heures
- Décongeler un tube de virus WN 05-21/3 en le plaçant dans la glace
  - Préparer les dilutions de virus ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  et  $4.10^{-5}$ ) :
    - Tube  $10^{-2}$  : 45  $\mu\text{L}$  de virus dans 4,5 mL de milieu ; tube  $10^{-3}$  : 0,5 mL de solution à  $10^{-2}$  dans 4,5 mL de milieu ; tube  $10^{-4}$  : 2,4 mL de solution à  $10^{-3}$  dans 21,6 mL de milieu ; tube  $10^{-5}$  : 0,5 mL de solution à  $10^{-4}$  dans 4,5 mL de milieu ; tube  $10^{-6}$  : 0,5 mL de solution à  $10^{-5}$  dans 4,5 mL de milieu ; etc... ; tube  $4.10^{-5}$  : 20 mL de solution à  $10^{-4}$  dans 30 mL de milieu)
  - Distribuer le virus
    - Plaques de séroneutralisation : 50  $\mu\text{L}$  par puits pour B1-B12 à H1-H12 avec la solution  $4.10^{-5}$
    - Plaque de titrage : 100  $\mu\text{L}$  par puits pour la dilution  $10^{-9}$  à la dilution  $10^{-2}$  et 50  $\mu\text{L}$  par puits pour la solution  $4.10^{-5}$
  - Incuber 1 heure à 37 °C sous 5% CO<sub>2</sub>

*Pendant ce temps, en pièce propre*

- Faire la numération des cellules et préparer une suspension cellulaire à  $5.10^5$  cellules par mL (soit 50 millions pour 9 plaques de séroneutralisation)

*De retour en P3*

- Distribuer 100  $\mu\text{L}$  de suspension cellulaire par puits
- Incuber 6 jours à 37 °C sous 5% CO<sub>2</sub>

*Jour J+6 : en P3*

- Vider les puits de leur contenu
- Distribuer 100  $\mu\text{L}$  par puits de Crystal violet et laisser incuber 15 minutes
- Vider les puits de leur contenu et les rincer 3 fois avec 200  $\mu\text{L}$  d'eau

## ANNEXE 5

### Calcul du titre infectieux par la méthode de Spearman-Kärber – Exemple –

Virus : Wn 05.21/3      Séroneutralisation Wn (en TCID50)  
Date : 05/10/05      Coloration : 11/10/05 (J6)  
"+" signifie "absence de lyse"

#### Calcul du titre infectieux d'un virus en TCID50/ml - Formules simplifiées Spearman-Kärber

v0 : µl/puits	100	raison dil°		10								
k : Log(r)	1.000											
Log Dil°	-2.000	-3.000	-4.000	-5.000	-6.000	-7.000	-8.000					
↳ a0	-5.000											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	-	-	-	+	+	+	-			+
B	-	-	-	-	+	+	+	+	-			+
C	-	-	-	-	-	+	+	+	-			+
D	-	-	-	-	-	+	+	+	-			+
E	-	-	-	-	-	+	+	+	-			+
F	-	-	-	-	-	+	+	+	-			+
G	-	-	-	-	-	+	+	+	-			+
H	-	-	-	-	-	+	+	+	-			+
Dilution	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	4E-5			Temoin
ni : puits/col.	8	8	8	8	8	8	8	8	8			8
n- : puits - /col	8	8	8	8	7	0	0	0	8			0
pi : n-/ni	1.000	1.000	1.000	1.000	0.875	0.000	0.000	0.000	1.000			
					pi	1-pi	ni	ni-1	pi*(1-pi)/(ni-1)			
					p0	1.000	0.000	8	7	0.000		
					p1	0.875	0.125	8	7	0.016		
					p2	0.000	1.000	8	7	0.000		
					p3	0.000	1.000	8	7	0.000		
					p4							
					Somme	1.875	-	-	-	0.016		
					m(a) =	-6.38				S(a)² =	0.01563	
					m(T) =	2.37E+07	TCID50/mL			S(a) =	0.125	
										a <sub>min</sub> =	-6.13	
										a <sub>max</sub> =	-6.63	
										1.33E+07 ≤ T ≤ 4.22E+07		
					m(a) = a0 + k/2 - k*somme(pi)		S(a)² = k² * somme (pi*(1-pi)/(ni-1))					
							a <sub>min</sub> = m(a)+2S(a)					
							a <sub>max</sub> = m(a)-2S(a)					
					m(T) = 1/v0 * 10 <sup>-m(a)</sup>							

## ANNEXE 6

### Primers utilisés pour la mise en évidence d'antigène WN par RT-PCR et Nested-PCR (Primers Lanciotti\*)

#### RT-PCR

Wn233

TTG TGT TGG CTC TCT TGG CGT TCT T

Wn640c

CAG CCG ACA GCA CTG GGC ATT CAT A

Zone amplifiée : capsid et préM

Taille du fragment : 407 paires des bases

#### Nested-PCR

Wn287

CAG TGC TGG ATC GAT GGA GAG G

Wn390

CCG CCG ATT GAT AGC ACT GGT

Zone amplifiée : capsid et préM

Taille du fragment : 103 paires de bases

\* Lanciotti, RS, Kerst, AJ, Nasci, RS, Godsey, MS et al. 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* 2000; 38: 4066-4071.

## ANNEXE 7

## Primers utilisés pour le séquençage total du virus WN

Région	Fragment	Nom primer	Séquence primer	TM	Taille	France2000 (AY268132)	Tunisie 1997 (AY268133)	Italie1998 (AF404757)	T. ann théo	T. ann testée
5'end	FG1	WN5'end	AGTAGTTCGCTGTGTGAGCTGAC	57		0%	0%	100%		
C		WN619c	CAGCCGACAGCACTGGACATTCATA	62	619	92% (-9;-24)	96% (-9)	92% (-9;-24)	55°	55°
C/prM	FG2	WN446	TGATCGCCAGCGTAGGAGCAGTTAC	62		92% (-18;-21)	100%	100%		
M		WN954c	GGCCACCAAAAAGCAATAGCACGACA	65	506	92% (-8;-16)	92% (-4;-16)	88% (-8;-16;-17)	60°	60°
M	FG3	WN871	CTGGTGGCAGCCGTCATTGGTTGGA	69		96% (-14)	96% (-14)	96% (-14)		
E		WN1720c	AGACTGCTTCGTGGCGTGTGGTTCC	66	849	96% (-16)	1	96% (-16)	64°	60°
E	FG4	WN1314	CGCCAAATTTGCCTGCTCTACCAAG	64		100%	100%	96% (-19)		
E		WN1823c	CCATCTTCACTCTACACTTCAAATG	509		100%	96% (-18)	100%		
E	FG5	WN1695	GGAACACACGCCACGAAGCAGTCT	66		96% (-10)	100%	96% (-10)		
E		WN2234c	GATCCAAAGTCCCAAGCTGTGTCTC	59	539	100%	96% (-5)	96% (-20)	57°	60°
E	FG6	WN1920	AGGTCACGGCACTGTGGTGTGGAA	65		100%	100%	100%		
NS1		WN2556c	TGTACCGGTCCATCCAAGCTCCAC	66	636	92% (-9;-21)	96% (-4)	96% (-21)	63°	60°
NS1	FG7	WN2414	GAGTCTGCTCTTCTCTCCGTGAA	61		100%	96% (-5)	100%		
NS1		WN3163c	TCTCAAGGACCCCTCACCCACAG	68	749	80% (-9;-12;-15;-16;-21)	83% (-9;-12;-15;-16)	80% (-9;-12;-15;-16;-21)	59°	60°
NS1	FG7bis	WN2389	ATGCTCTGTGACAGGTCATAGC	60	757	100%	100%	100%		
NS1		WN3146c	GGCCACGTGCATGATTGGA	60		100%	95% (-11)	100%		60°
NS1	FG8	WN2712	GTGGTTGAGA AACAGGAGGGGATGT	60		96% (-5)	96% (-5)	96% (-5)		
NS2a		WN3663c	TCAGTGTAAAGTGATGCCCAAAACA	61	951	92% (-14;-17)	96% (-14)	92% (-14;-17)	58°	60°
NS1	FG9	WN3316	AGTGGCGGATCGTGGACCTGC	70		91% (-12;-15)	91% (-12;-15)	91% (-12;-15)		
NS2a		WN3838cbis	AACAGCCGCCAACATCAACAAGATG			96% (-22)	96% (-4)	100%		
NS2a	FG10	WN3638	TGTTTGGGGGCATCACTACACTGA	61		92% (-9;-12)	96% (-12)	92% (-9;-12)		
NS2b		WN4438c	CGTCAAGCCGAACATCAACTTTTC	60	800	92% (-15;-24)	88% (-9;-15;-24)	92% (-15;-24)	58°	60°
NS2a	FG11	WN3958	AATGTGGTCGTCCTGCTGCTGCG	68		83% (-8;-12;-15;-21)	91% (-3;-15)	83% (-8;-12;-15;-21)		
NS3		WN4877	TGCACCTCATCTTGCCCATCCA	63	919	91% (-6;-12)	91% (-6;-12)	91% (-6;-12)	61°	60°
NS3	FG11bis	WN4368	GATATGTGGATCGAGGAGCGG	61		95% (-20)	91% (-5;-20)	100%		
NS3		WN5122	TCCTTACCCCTGCACATCGC	62	754	100%	100%	100%		60°
NS3	FG12	WN4848	GCACAAGTGAATGGGCAAGATGAG	63		88% (-7;-13;-22)	92% (-13;-22)	88% (-7;-13;-22)		
NS3		WN5312c	ATAGGCAATCCTCTTAGGGCTTCA	57	464	92% (-10;-17)	88% (-7;-10;-21)	92% (-10;-17)	55°	55°
NS3	FG12bis	WN4890	TGAGGTGCAGATGATTGTGG	57						
NS3		WN5398c	GGCACATGACATCAACAATCTC	57	508					55°
NS3	FG13	WN5119	GCCGGATTTCGAACCTGAGATGTTGA	64		96% (-4)	96% (-4)	96% (-4)		
NS3		WN5808c	GACAAAGTCCCAATCATCTCTT	55	688	100%	100%	100%	53°	55°
NS3	FG14	WN5289	TGAAGCCCTAAGAGGATTCCTAT	57		92% (-8;-15)	88% (-3;-15;-18)	92% (-8;-15)		
NS3		WN6340c	GATGACTTCCACTTCATTGTTGCT	53	1050	96% (-10)	96% (-10)	96% (-10)	51°	50°
NS3	FG15	WN6013bis	GAGGGCACACGAATGAGGACGACTC	63		96% (-9)	92% (-9;-24)	96% (-9)		
NS4b		WN6936c	GCTTATGTCACTTTGGTCTTGTG	52	919	100%	100%	95% (-22)	50°	50°
NS4a	FG15bis	WN6694	GGCATGTGAAAGATAGGCTCTGG	59		100%	91% (-4;-11)	100%		
NS4b		WN7295c	GGAACCATGTAGGCATAGTGGC	59	601	100%	95% (-11)	100%		60°
NS4b	FG16	WN6895	AATGAGATGGGTGGCTGGACAAGA	62		88% (-8;-20;-23)	88% (-8;-20;-23)	84% (-5;-8;-20;-23)		
NS4b		WN7424c	GCATGATCTGTCCAATTTCTTCT	53	529	92% (-11;-17)	96% (-17)	92% (-11;-17)	51°	50°
NS4b	FG16bis	WN6799	TCCTTCTCTTGATGATTGTGC	58		100%	100%	100%		
NS4b		WN7435c	CGACCTTCTTCTGCATGATGG	59	636	100%	95% (-17)	100%		55°
NS4b	FG17	WN7243	CTTCTGTCTGCCATTATGCCTACA	57		96% (-11)	84% (-5;-11;-20;-23)	96% (-11)		
NS5		WN7770c	GCGGTCGACTTCAGTGTGGCTTCT	64	527	84% (-4;-12;-13;-22)	84% (-4;-12;-13;-22)	84% (-4;-12;-13;-22)	55°	55°
NS5	FG18	WN7700	AAAGACTTAAACAGATGACGAAAGA	53		92% (-6;-18)	92% (-6;-18)	92% (-6;-18)		
NS5		WN8457c	TGCTCTCGTTCGCTTCCCAAGTT	64	757	87% (-12;-18;-21)	87% (-12;-18;-21)	87% (-12;-18;-21)	51°	50°
NS5	FG19	WN8037	TGAAGAGTGGGGTGGATGTTCTA	58		96% (-15)	96% (-15)	96% (-15)		
NS5		WN8822cbis	ctctggccaggaacgccacaac	785		100%	91% (-13;-14)	96% (-13)		
NS5	FG20	WN8767	GAAGGAGTGAAGTATGTGCTCAATG	54		100%	96% (-2)	100%	54°	50°
NS5		WN9328c	GCACCTTAGCTTCAATTTTC	54	561	100%	100%	100%		
NS5	FG21	WN9211	GGCTACATCTGCGTGAAGTTGG	60		96% (-21)	96% (-21)	96% (-21)		
NS5		WN9794c	GGAACTGCTGCCAATCATACCATC	61	583	100%	100%	100%	60°	60°
NS5	FG22	WN9661bis	CAGCGGAGATGACTGTGTGTTAAAGCC			100%	96% (-24)	96% (-12)		
NS5		REV1	CCGATGATGCTCTGACTTTGGT	57	637	96% (-21)	96% (-21)	96% (-21)	55°	55°
NS5	FG22bis	WN9610	AAAGGACCCAAAGTCAGGACC	58						
NS5		WN10311c	TGCTCTGACTTGGTTGATAGCC	58	701					55°
NS5	FG23	WN10141	TGGATGGAGGACAAAACCCCACT	60		96% (-15)	96% (-15)	96% (-15)		
3'NT		REV2	GCCTTTGTTAACCCAGTCTCTCT	57	583	100%	96% (-11)	100%	55°	55°
NS5	FG23bis	WN10118	ACATGCTGGAGGTTTGAAC	56	600	100%	95% (-7)	100%		
3'NT		WN10718c	CACTATCGCAGACTGCATCTCT	56		100%	100%	100%		55°
3'NT	FG24	WN10571	TCCATGTAAGCCCTCAGAACCCTCT	61		96% (-9)	100%	100%		
3'NT		WN3'END	CTGTGCCGTGTGGCTGGTTGTTCAG	65	395	100%	100%	100%	59°	60°
3'NT	FG24bis	WN 10584	ATGTAAGCCCTCAGAACCCTCT	57						
3'NT		WN 11009	AGATCTGTGTTCTCGACC	56	425					55°

**Résumé :**

Le travail présenté ici s'intéresse au rôle des oiseaux sauvages dans l'épidémiologie du virus West Nile (WN) en Camargue. Des espèces d'oiseaux susceptibles d'intervenir dans les différentes phases de circulation du virus (introduction, amplification, dispersion, émergence) sont identifiées en s'appuyant sur les données bibliographiques relatives à la maladie et sur des critères ornithologiques. Les investigations épidémiologiques effectuées pour quelques unes de ces espèces en 2004 (année épizootique) et en 2005 (année post-épizootique) montrent que le virus WN circule dans la population d'oiseaux de Camargue. Pour les oiseaux migrateurs arrivant d'Afrique au printemps, les dates et lieux de ces contacts restent inconnus. Concernant les oiseaux sédentaires, deux isolats d'une même souche virale ont été obtenus en 2004, réciproquement à partir du cerveau d'une Pie bavarde *Pica pica* et d'un Moineau domestique *Passer domesticus*, et totalement séquencés. L'étude phylogénétique de cette souche montre qu'elle appartient au même cluster que celles précédemment isolées en Europe méditerranéenne. Les résultats sérologiques et virologiques chez ces deux espèces d'oiseaux, souvent observées à proximité des écuries, en font des candidates à l'amplification et l'émergence du virus WN chez les chevaux de Camargue. La mise en évidence, en 2005, d'ARN viral dans les fientes d'une Pie bavarde conforte cette hypothèse. Les recherches doivent se poursuivre pour évaluer la part respective des différents oiseaux de Camargue dans la circulation du virus WN en utilisant d'autres approches, comme par exemple l'analyse des repas de sang des moustiques vecteurs, récemment identifiés.

**Mots-clés :**

West Nile, oiseaux sauvages, Camargue, éco-épidémiologie