



HAL
open science

Circulation enzootique du virus West Nile en population équine : identification de facteurs de risque environnementaux en Camargue, France

Sophie Pradier

► To cite this version:

Sophie Pradier. Circulation enzootique du virus West Nile en population équine : identification de facteurs de risque environnementaux en Camargue, France. Santé publique et épidémiologie. AgroParisTech, 2010. Français. <NNT : 2010AGPT0085>. <pastel-00605812>

HAL Id: pastel-00605812

<https://pastel.hal.science/pastel-00605812v1>

Submitted on 4 Jul 2011

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.



HAL Authorization



Doctorat ParisTech

THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

**L'Institut des Sciences et Industries
du Vivant et de l'Environnement
(AgroParisTech)**

Spécialité : Epidémiologie animale

présentée et soutenue publiquement par

Sophie PRADIER

le 15 Décembre 2010

**Circulation enzootique du virus West Nile en population
équine : identification de facteurs de risque environnementaux
en Camargue, France**

Directeur de thèse : **Agnès LEBLOND**

Jury

Mme Nathalie BAREILLE, Maître de Conférences HDR, UMR 1300 BIOEPAR, INRA-ONIRIS

M. Didier CALAVAS, Directeur ANSES, Laboratoire de Lyon

Mme Annelise TRAN, Chercheur, UPR AGIRs, UMR TETIS, CIRAD

M. Alain SANDOZ, Professeur associé, DENTES, Université de Provence, Fondation Tour du Valat

M. Henri-Jean BOULOUIS, Professeur, UMR 956 BIPAR, ANSES-Univ. Paris Est Créteil-ENVA USC INRA

Mme Agnès LEBLOND, Professeur, UR 346 Epi-A, Pôle équin, INRA- VetAgroSup

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Remerciements

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

Nathalie Bareille et Didier Calavas pour avoir accepté d'être mes rapporteurs,

Henri-Jean Boulouis pour ses conseils avisés et sa disponibilité,

Annelise Tran pour nos échanges toujours très enrichissants et très productifs, son dynamisme et sa bonne humeur,

Alain Sandoz pour son optimisme sans faille et ces nombreux séjours entre Marseille et le Sambuc si agréables et pourtant si studieux !

Agnès Leblond pour m'avoir proposé ce sujet passionnant et m'avoir soutenue, encadrée et supportée depuis de nombreuses années !

Je remercie également tous les membres de l'équipe de recherche d'Epidémiologie Animale de Theix pour leur accueil et leur contribution à cette thèse. Un merci particulier à Christian Ducrot pour son aide précieuse pendant ces quatre années et la relecture attentive de ce manuscrit.

Je remercie Benoît Durand pour avoir accepté d'être dans mon comité de thèse et de m'avoir aidée à aller au bout de ce premier article de recherche. J'espère bien qu'il y en aura d'autres !

Je remercie toute l'équipe du laboratoire de virologie de Maisons-Alfort et particulièrement Stephan Zientara pour ses conseils et son aide au bon moment pour ce manuscrit, Josiane Maingault pour tout le temps qu'elle a passé sur mes analyses et Sylvie Lecollinet pour son soutien sans faille, ses relectures attentives dans des délais incroyables et sa constante bonne humeur.

Je remercie Gaëtan Lefebvre et Joël Chadoeuf pour leur participation fructueuse à ce travail et leur pédagogie.

Je remercie les étudiants qui m'ont accompagnée et beaucoup aidée pour les enquêtes en Camargue, en particulier Elsa Moulin qui a été un super bras droit !

Je remercie les nombreux propriétaires de chevaux et vétérinaires de Camargue qui ont participé aux enquêtes, souvent depuis de nombreuses années, mais qui n'ont pas perdu leur motivation et leur gentillesse !

Parfois certains sont devenus des amis... Un énorme merci à Frédéric Fourmaud, sans qui rien n'aurait été possible ! Et à toutes les personnes autour de lui qui m'ont assistée et supportée !

Je remercie toute l'équipe de la Clinique équine qui m'a permis d'aller au bout de cette thèse.

Merci à Fabrice Audigié et Aude Giraudet pour leur soutien infaillible.

Merci à Sarah Ménager pour m'avoir constamment épaulée ces deux dernières années, sans toi je n'y serai pas arrivée !

Enfin un grand merci à toute ma famille et tous les amis qui ont vécu la thèse en direct pendant quatre ans, qui ont tous été embauchés à un moment ou un autre et qui m'ont permis de franchir la ligne d'arrivée !

Merci à Erwan.

Avant-propos

Après un internat à la Clinique des Equidés de VetAgroSup sur le Campus Vétérinaire de Lyon, j'ai débuté ma carrière d'enseignante en septembre 2004 en tant que chargée de consultation à la clinique équine de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (ENVA). Depuis cette date, j'enseigne aux étudiants vétérinaires de 2^{ème} et 3^{ème} cycles, la médecine interne et l'anesthésie des Equidés sous la forme de travaux cliniques lors des consultations sur rendez-vous et des urgences et de travaux pratiques et dirigés. Ma charge d'enseignement annuelle correspond à 250 heures « équivalents cours magistraux » environ.

En parallèle, pendant l'année scolaire 2005-2006, j'ai obtenu un diplôme de Master 2R en Méthodes de Recherche en Environnement et Santé (MRES) à Grenoble. En novembre 2006, j'ai débuté cette thèse de 3^{ème} cycle, tout en poursuivant mon activité d'enseignement à la clinique équine de l'ENVA et en assumant une part toujours croissante de charges administratives (responsable de la pharmacie équine, responsable de l'internat...). En septembre 2007, j'ai obtenu un poste de Maître de Conférences Contractuel en médecine interne et anesthésie équines dans ce même service.

La dualité du statut d'enseignant-chercheur est alors vraiment devenue pour moi une réalité. J'ai poursuivi mes activités d'enseignement à la clinique équine en parallèle de l'activité de recherche dans le cadre de cette thèse. L'activité au sein de la clinique équine n'a fait qu'augmenter depuis la fin de l'année 2004. Les consultations en médecine interne sont passées de 140 en 2004 à 220 en 2009. Le nombre d'urgences accueillies dans le service a également fortement augmenté : 50 en 2004 à plus de 100 en 2009. Ce statut d'enseignant-chercheur m'a conduite, en parallèle de ce travail de recherche, à publier également des articles de formation continue (liste de publications en Annexe 1).

L'obtention d'une thèse d'université me permettra de me présenter à un concours de Maître de Conférences en médecine interne des équidés à l'ENVA, qui sera ouvert au printemps 2011. Grâce à ce poste de Maître de Conférences, les recherches débutées pendant cette thèse en épidémiologie des maladies infectieuses du cheval pourront être poursuivies et développées dans une unité de recherche de l'ENVA.

Table des matières

I. PROBLEMATIQUE, CONTEXTE ET QUESTION DE RECHERCHE	15
A. EPIDEMIOLOGIE DU VIRUS WEST NILE ET FACTEURS POUVANT MODIFIER SA DISTRIBUTION	16
1. <i>Complexité du cycle épidémiologique du virus West Nile :.....</i>	<i>16</i>
2. <i>Article : “Review on West Nile epidemiology and factors triggering change in its distribution”</i>	<i>19</i>
3. <i>Conclusion</i>	<i>45</i>
B. SITUATION DU VIRUS WEST NILE EN FRANCE	47
1. <i>Historique du virus West Nile en France</i>	<i>47</i>
2. <i>Description de la zone d’étude principale : La Camargue.....</i>	<i>56</i>
3. <i>Le cheval en région Camargue.....</i>	<i>68</i>
C. QUESTION DE RECHERCHE ET HYPOTHESES DE TRAVAIL.....	83
II. TRAVAUX PERSONNELS ET RESULTATS	87
A. MATERIEL ET METHODES	87
1. <i>Description des enquêtes en population équine en 2007 et 2008.....</i>	<i>87</i>
2. <i>Données environnementales utilisées.....</i>	<i>91</i>
B. ETUDE SUR LE PAYSAGE ET LA CIRCULATION DU VIRUS WEST NILE EN CAMARGUE ET DANS LE VAR.....	100
1. <i>Résumé de l’article :.....</i>	<i>101</i>
2. <i>“Land Cover, Landscape Structure, and West Nile Virus Circulation in Southern France ».....</i>	<i>102</i>
C. INFLUENCE DE L’EAU SUR LA CIRCULATION DU VIRUS WEST NILE CHEZ LES CHEVAUX EN REGION CAMARGUE.....	115
1. <i>Résumé de l’article.....</i>	<i>116</i>
2. <i>“Influence of water on the circulation of the West Nile Virus in horses in Southern France” ...</i>	<i>117</i>
D. ETUDE DES MECANISMES DE TRANSMISSION DU VIRUS WEST NILE EN REGION CAMARGUE	150
1. <i>Résumé de l’article.....</i>	<i>151</i>
2. <i>“Assessment of transmission processes of West Nile virus in Southern France using an ecological and landscape approach”</i>	<i>155</i>

III. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	187
A. MISE EN ŒUVRE DU TRAVAIL ET METHODOLOGIE	187
B. RESULTATS ACQUIS	194
C. PERSPECTIVES A COURT ET MOYEN TERME	198
IV. CONCLUSION GENERALE.....	201
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	203
ANNEXES.....	213

Table des figures

FIGURE 1 : SCHEMA SIMPLIFIE DU CYCLE EPIDEMIOLOGIQUE DU VIRUS WEST NILE.....	15
FIGURE 2: SCHEMA DES CYCLES DE TRANSMISSION DU VIRUS WEST NILE	45
FIGURE 3: PHOTOGRAPHIE D'UN PAYSAGE DE SANSOUIRE HAUTE (SOURCE : DR ELSA MOULIN)	63
FIGURE 4: SCHEMA REPRESENTATIF DE LA METHODE UTILISEE.....	84
FIGURE 5: FACTEURS ASSOCIES A LA PROBABILITE DE CONTACT D'UN CHEVAL AVEC LE VIRUS WN	85

Table des cartes

CARTE 1: LE VIRUS WEST NILE EN CAMARGUE 1962-2004.....	50
CARTE 2: GEOGRAPHIE DE LA CAMARGUE.....	58
CARTE 3: REPARTITION DES ECURIES VISITEES EN 2004, 2007 ET 2008	60
CARTE 4: LE BERCEAU DE LA RACE CAMARGUE	72

Table des tableaux

TABLEAU 1: ESTIMATION DE LA POPULATION EQUINE DANS LES TROIS DEPARTEMENTS D'INTERET :	79
TABLEAU 2: ESTIMATION DE LA POPULATION EQUINE DANS LA ZONE D'ETUDE (TERRY 2007) :.....	79
TABLEAU 3: DESCRIPTIF DETAILLE DES ENQUETES	90
TABLEAU 4: TABLEAU COMPARATIF DES SATELLITES LANDSAT ET SPOT	94

Table des annexes

ANNEXE 1: LISTE DES PUBLICATIONS EN SEPTEMBRE 2010.....	214
ANNEXE 2: DOCUMENTS UTILISES PENDANT LES ENQUETES DE 2007 ET 2008	217
ANNEXE 3: RAPPORT DE VALIDATION INTERNE DU KIT ID SCREEN.....	225

Circulation enzootique du virus West Nile en population équine : identification de facteurs de risque environnementaux en Camargue, France

Lors du congrès EDEN (*Emerging Diseases in a changing European eNvironment*) en mai 2010, James Mills du CDC (*Center for Diseases Control, USA*) a dressé un bilan des maladies infectieuses émergentes dans le monde, 175 sont actuellement répertoriées et 75 % d'entre elles sont des zoonoses. Depuis le début du 20^{ème} siècle, les maladies vectorielles, comme le paludisme, la dengue ou la maladie de West Nile, ont été responsables de plus de morts chez les humains, que toutes les autres causes de mortalités confondues (Kalluri et al. 2007). Les maladies vectorielles, transmises par les moustiques en particulier, sont parmi les causes principales de maladie et de décès dans le Monde. Ainsi l'importance de l'étude des maladies infectieuses émergentes, en particulier zoonotiques et vectorielles, n'est plus à démontrer d'un point de vue sanitaire, aussi bien pour l'Homme que pour l'Animal.

La maladie de West Nile (WN) s'inscrit parfaitement dans ce cadre. Cette arbovirose, transmise essentiellement par des moustiques, est causée par un *Flavivirus* de la famille des *Flaviviridae*. Les oiseaux sauvages sont les hôtes-réservoirs principaux et jouent un rôle essentiel dans la dissémination du virus d'un pays à un autre. Les moustiques des genres *Culex* et *Aedes* sont les principaux vecteurs biologiques. Le cheval et l'homme sont des hôtes accidentels et des « culs-de-sacs » épidémiologiques. En comparaison des nombreux autres mammifères pouvant être infectés par le virus WN, le cheval et l'homme semblent être les plus sensibles. Chez ces hôtes, la maladie se traduit par des formes variables allant de l'infection asymptomatique au décès, en passant par un syndrome grippal bénin ou des troubles neurologiques graves (10 % des chevaux infectés et 1 % des hommes infectés) (Castillo-Olivares et al. 2004).

Le virus West Nile, isolé pour la première fois chez l'Homme en 1937 en Ouganda et enzootique dans beaucoup de pays dans le Monde, était considéré comme un virus peu pathogène jusqu'à son introduction à New York en 1999 et son expansion fulgurante dans le Nouveau Monde. Cet arbovirus possède actuellement la zone de distribution mondiale la plus large. En Europe, les épidémies les plus importantes en nombre de cas humains ont eu lieu à Bucarest en 1996 (393 hospitalisations, 17 morts) et à Volgograd en 1999 (826 hospitalisations, 40 morts) (Reiter 2010).

Les conséquences de la maladie de WN chez l'homme peuvent être importantes et des séquelles persistent souvent plus d'un an : fatigue, santé physique médiocre, dépression, incapacité sévère à modérée (Trevejo et al. 2008). Cette maladie occasionne des frais majeurs de soins et d'hospitalisations, ainsi que des pertes économiques dues aux arrêts de travail à cause de la sévérité des signes cliniques et de la longue durée de la maladie (Trevejo et al. 2008). Komar en 2000 a estimé le montant des dépenses publiques pour l'épidémie de WN en 1999 dans l'état de New York à plus de 15 millions de dollars (Komar 2000).

Cette maladie a également des conséquences très importantes sur la filière équine en cas d'épizootie : mortalité (22 % en France en 2004 (Zeller et al. 2004a)), morbidité avec des séquelles potentielles, frais de soins et d'hospitalisation, mesures de prévention par vaccination, restrictions des mouvements commerciaux des chevaux vaccinés aux USA vers les autres pays où le vaccin est interdit (Komar 2000).

Depuis 1999, les publications sur ce virus n'ont cessé d'augmenter aux USA, mais aussi en Europe et notamment en France, depuis le retour inattendu du virus en Camargue en 2000. La situation épidémiologique récente du virus WN en Italie depuis 2008, où une émergence de cas équins et humains est survenue dans plusieurs régions de ce pays, contribue à entretenir l'intérêt des chercheurs, mais aussi l'inquiétude des autorités sanitaires. La déclaration de nombreux foyers de WN à partir d'août 2010, de cas humains en Grèce, Russie, Turquie, Roumanie et Hongrie, et équins en Grèce, Italie, Espagne, Bulgarie et Maroc, va certainement contribuer à renforcer leur vigilance (Alertes consultables sur les sites : <http://www.oie.int> et <http://www.promedmail.org> , consultés le 13 octobre 2010).

Les mécanismes principaux de transmission du virus WN sont décrits depuis les années 1950 (Hurlbut et al. 1956), mais en 2010 l'épidémiologie de ce virus n'est toujours pas complètement comprise. Il subsiste encore de nombreuses questions, en particulier concernant l'identification des espèces d'oiseaux réservoir. Or pour pouvoir lutter efficacement contre une maladie, il est primordial de bien connaître les mécanismes de transmission de l'agent pathogène et les acteurs du cycle épidémiologique.

Du fait de sa transmission principalement vectorielle, la circulation du virus WN est fortement influencée par des facteurs environnementaux. La présence, l'abondance des vecteurs et des réservoirs, ainsi que les contacts entre eux sont déterminés par un environnement particulier.

Il paraît donc logique et essentiel de mieux caractériser le lien entre cet environnement et la circulation du virus WN. L'utilisation d'indicateurs environnementaux pertinents, dans des

zones connues de circulation du virus, peut permettre de conforter des hypothèses sur les espèces impliquées dans le cycle épidémiologique du virus, mais aussi sur les mécanismes de transmission. Identifier des facteurs de risque environnementaux peut servir également à l'élaboration de cartes prédictives de circulation virale permettant de cibler les actions de surveillance, de prévention et/ou de lutte dans la zone étudiée, mais aussi dans d'autres zones.

L'objectif de notre travail est d'évaluer le risque de circulation enzootique du virus WN en Camargue, zone où ce virus a déjà circulé à plusieurs reprises (1962, 2000, 2004). Ce risque sera évalué à partir de données collectées chez le cheval, hôte accidentel mais particulièrement sensible à l'infection et souvent considéré comme un révélateur de la circulation virale dans une région donnée (Ostlund et al. 2000). L'étude de l'enzootie est une première étape qui précède l'étude de l'émergence de cas cliniques chez le cheval. En effet en 2000 en Camargue, en 2003 dans le Var et en 2006 dans les Pyrénées Orientales, les cas cliniques équins ont été observés en bordure de zones considérées comme favorables à la circulation du virus WN (Durand et al. 2002, Durand et al. 2005, Eloït 2006). Il paraît donc intéressant d'identifier et de caractériser dans un premier temps les zones enzootiques, puis dans un second temps d'identifier les conditions favorables à une émergence. Le cadre de ce travail se limitera à l'étude de la circulation enzootique du virus WN, à partir de données sérologiques équines, révélatrices d'un contact entre le cheval et ce virus.

Ce document comprend trois parties. Dans la première partie, sont présentés :

- la problématique de ce travail, en décrivant l'épidémiologie du virus WN et les facteurs pouvant influencer sur sa distribution,
- le contexte du travail, en exposant l'historique du virus WN en France, les particularités de la zone d'étude principale : la Camargue et la place du cheval dans cet environnement particulier,
- la question de recherche et les hypothèses de travail.

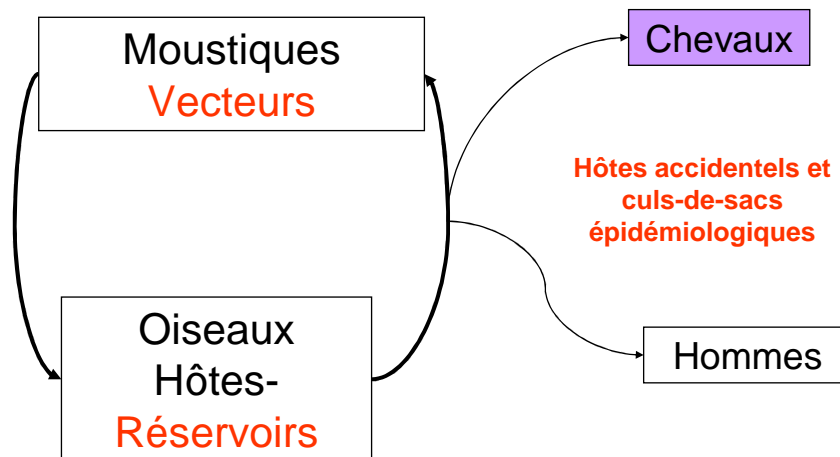
Dans une deuxième partie, les travaux personnels sont exposés, en décrivant tout d'abord les enquêtes effectuées en Camargue en 2007 et 2008 et les données environnementales utilisées dans ces travaux, puis en présentant successivement les trois études menées pendant cette thèse : la première sur le paysage et son lien avec la circulation enzootique du virus WN chez le cheval en Camargue et dans le Var, la deuxième sur l'influence de l'eau sur cette circulation en Camargue et la troisième sur les mécanismes de transmission du virus WN en Camargue.

Dans la troisième partie, une discussion générale et synthétique sur ces travaux est développée et des perspectives sont proposées.

I. PROBLEMATIQUE, CONTEXTE ET QUESTION DE RECHERCHE

Les articles anciens de Taylor et coll. en 1956 sur l'écologie du virus WN en Egypte ou encore ceux de Joubert, Oudar et coll. dans les années 1960-70 en Camargue décrivent déjà de manière détaillée le cycle épidémiologique du virus WN (Hurlbut et al. 1956, Joubert et al. 1974) (Figure 1). En 2010, le bilan des connaissances acquises sur ce cycle montre que nous sommes encore loin d'avoir des certitudes sur plusieurs éléments majeurs. Le cycle principal se déroule entre les moustiques vecteurs et les oiseaux réservoirs. Sous l'influence de certains paramètres environnementaux et/ou météorologiques, une espèce « pont » (*bridge vector*) peut transmettre le virus à des hôtes accidentels, chevaux ou hommes.

Figure 1 : Schéma simplifié du cycle épidémiologique du virus West Nile



A. Epidémiologie du virus West Nile et facteurs pouvant modifier sa distribution

1. Complexité du cycle épidémiologique du virus West Nile :

Il existe de réelles difficultés dans l'identification des espèces de moustiques vectrices et d'oiseaux réservoir du virus WN, partout dans le Monde, y compris aux USA où la recherche est très active dans le domaine, du fait des enjeux sanitaires et économiques. Ces difficultés sont probablement liées à la complexité du cycle épidémiologique du virus WN faisant intervenir plusieurs espèces pour un même rôle et/ou différentes espèces pour des rôles mineurs de diffusion (vecteurs-pont, espèce d'oiseau réservoir pour l'introduction différente de l'espèce qui amplifie le virus et qui le disperse...). Des mécanismes probablement anecdotiques peuvent rendre encore plus complexe ce cycle, comme la survie du virus pendant l'hiver dans un moustique (« *overwintering* »), une transmission verticale du virus chez le moustique ou encore la transmission directe entre oiseaux, comme la voie oro-fécale (excréments, cadavres)... Cette dernière pourrait expliquer l'amplification et la diffusion rapide du virus aux USA, alors que la transmission locale aurait été assurée plutôt par les moustiques (Reiter 2010). Bien que la virémie chez les mammifères soit insuffisante pour transmettre le virus aux moustiques, une infection chronique de ces animaux pourrait contribuer à la transmission aux oiseaux charognards, rapaces, hiboux et alligators (Miller et al. 2003, Reiter 2010).

Pour déterminer les espèces impliquées comme vecteurs et réservoirs dans le cycle épidémiologique d'un arbovirus, il est nécessaire de s'appuyer sur des données expérimentales de compétences vectorielles et de réservoir, des données d'isolements multiples du virus sur les hôtes et vecteurs après infection naturelle et des données sérologiques sur les hôtes réservoirs et/ou accidentels, ce qui implique la collecte d'une quantité très importante d'informations (Komar 2000). Les études sérologiques sur les hôtes sont bien sûr insuffisantes à elles seules pour déterminer le rôle des espèces prélevées, puisque une séropositivité ne signe qu'un contact avec le virus.

De même, il serait très hasardeux de conclure à l'implication d'une espèce de moustiques dans la transmission du virus, avec le seul argument que plusieurs individus ont été trouvés naturellement infectés par le virus sur le terrain, même à plusieurs reprises. En effet il peut s'agir de faux positifs à l'analyse (contamination, erreur de manipulation). L'ARN viral

déecté par RT-PCR n'est pas forcément signe d'une présence de virus actif. Les moustiques infectés ne sont pas forcément capables d'être infectants. Enfin le moustique a pu se gorger très récemment sur un animal virémique (Balenghien 2006).

Il est admis que les moustiques sont les principaux vecteurs du virus WN depuis les années 1950 (Hurlbut et al. 1956) et sa transmission expérimentale par ces insectes a été obtenue dès 1943 (Philip et al. 1943). Pour une revue détaillée du rôle des moustiques dans la transmission du virus WN, en particulier en France, le lecteur pourra se reporter à Balenghien (Balenghien 2006).

En France, la question de savoir quelles espèces de moustiques transmettent le virus aux hôtes mammifères accidentels est toujours posée, puisque les *Culex* présents sont ornithophiles. Deux hypothèses ont été avancées :

-l'implication de moustiques opportunistes ou non strictement mammamophiles, suffisamment compétents pour le virus WN, appelés dans la littérature « *bridge vectors* », comme les *Aedes* (Turell et al. 2005).

-la participation de *Culex* non strictement ornithophiles, comme *Culex pipiens* dans certains pays (Balenghien 2006). La variation des préférences trophiques d'un moustique peut être liée à un déterminisme génétique (différentes formes de la même espèce, hybrides), des conditions environnementales particulières (température, teneur en matière organique des gîtes larvaires) et enfin à une disponibilité variable des hôtes préférentiels au cours de la saison (Balenghien 2006).

Les oiseaux sont considérés comme les hôtes naturels du virus WN depuis 1956 (Hurlbut et al. 1956) pour trois raisons majeures :

-l'isolement régulier du virus chez les Oiseaux dans le Monde,

-l'association de clusters de mortalité aviaire et d'une intense transmission du virus à l'Homme et au Cheval aux USA (Mostashari et al. 2003, Roberts et al. 2006, Liu et al. 2009a, Rios et al. 2009, Veksler et al. 2009),

-l'observation de virémies intenses et prolongées chez certaines espèces d'oiseaux, comme les Passériformes (Reisen et al. 2005, Nemeth et al. 2009).

D'autres cycles de transmission que celui classiquement décrit, par exemple avec la participation d'autres hôtes amplificateurs que les Oiseaux ou la présence d'une transmission non virémique, sont discutés dans notre article de revue. Une discussion très détaillée d'autres cycles potentiels est également menée par Balenghien (Balenghien 2006).

En plus de la transmission vectorielle bien établie du virus, l'Homme peut être infecté directement par transfusion sanguine, transplantation d'organes (CDC 2002a, Kotton 2007) et, plus rarement, par voie transplacentaire (CDC 2002b, O'Leary et al. 2006), par l'allaitement (CDC 2002c, Hinckley et al. 2007) et par dialyse (2004). Une infection lors d'activités professionnelles est également possible par voie conjonctivale (Fonseca et al. 2005), percutanée lors de manipulations de tissus infectés ou de matières fécales d'animaux infectés et peut-être par aérosols (lors de charges virales très élevées), par exemple pour les vétérinaires lors d'autopsies (Venter et al. 2009), les techniciens de laboratoire (CDC 2002d) ou les éleveurs avicoles (CDC 2003).

Chez les Oiseaux, il est maintenant clairement établi qu'une transmission non vectorielle par voie oro-fécale ou par l'ingestion de carcasses existe, mais il reste à déterminer son importance relative.

Les hypothèses de Paul Reiter sur les mécanismes de transmission par voie oro-fécale dans l'épidémie de WN aux USA sont les suivantes (Reiter 2010) :

- 1) Les corbeaux morts loin de leur nid transmettent par infection orale le virus aux oiseaux des nids voisins.
- 2) La transmission oro-fécale est significative dans les nids surpeuplés.
- 3) Les corbeaux se nourrissant de carcasses d'autres animaux/oiseaux infectés introduisent le virus dans leur nid.
- 4) Les adultes virémiques et les juvéniles infectent les oisillons par voie orale.

Les situations épidémiologiques du virus WN sont très proches entre l'Europe, l'Amérique centrale, du Sud et les Caraïbes (Gubler 2007). Peu d'épidémies et d'épizooties se sont déclarées et peu de cas cliniques ont été rapportés dans ces régions du Monde. Cette situation pourrait être liée à une circulation ancienne du virus WN ou de virus très proches, comme les virus de l'encéphalite de Saint Louis ou de la Dengue, conférant une protection croisée aux populations locales. D'autre part, les oiseaux infectés par des souches très virulentes ne

seraient pas en mesure de migrer, mais cette explication est *a priori* démentie par des études expérimentales. Une sélection de souches moins virulentes pourrait se faire dans les populations d'hôtes par des facteurs environnementaux ou d'autres facteurs non identifiés. Par exemple, les souches virales isolées au Mexique ont montré une capacité de réplication réduite chez les oiseaux (Reisen et al. 2007a).

A l'inverse, aux Etats-Unis, le virus a gagné de vastes territoires en très peu de temps. Les hypothèses actuellement formulées pour expliquer cette diffusion rapide du virus sur un territoire sont (Gubler 2007) :

- les déplacements des oiseaux migrateurs,
- l'émergence d'une souche avec un potentiel épidémique et une virulence plus grands, comme en Israël (cas de mortalité chez des oies) de 1997 à 1999, puis lors du passage à l'Ouest (USA),
- un large spectre d'hôtes (plus de 300 espèces d'oiseaux et plus de 30 espèces non aviaires) et de vecteurs (61 espèces de moustiques) à la disposition du virus,
- et la rencontre de populations d'hôtes naïfs, dans ce pays où aucune émergence due au virus WN n'avait été rapportée avant 1999.

De très nombreux articles de revue sont aujourd'hui publiés sur le virus WN, insistant, en fonction de la politique éditoriale du journal, sur différents points de la connaissance du virus WN aux USA (Komar 2000, Hayes 2001, Campbell et al. 2002, Castillo-Olivares et al. 2004, Gerhardt 2006, Gubler 2007, Kramer et al. 2007, Reisen et al. 2007a, Kramer et al. 2008, Petersen et al. 2008, Trevejo et al. 2008, Brault 2009, Gyure 2009) et en Europe (Hubalek et al. 1999, Murgue et al. 2001a, Zeller et al. 2004b, Couissinier-Paris 2006). Ils pourront apporter des compléments intéressants par rapport à la publication ci-après.

2. Article : "Review on West Nile epidemiology and factors triggering change in its distribution"

Cet article a été soumis à la Revue Scientifique et Technique de l'OIE en mai 2010. L'article sous son format de soumission est intégré directement au texte.

**REVIEW ON WEST NILE VIRUS EPIDEMIOLOGY AND FACTORS TRIGGERING CHANGE IN
ITS DISTRIBUTION**

S. Pradier ^(1,2), S. Lecollinet⁽³⁾ & A. Leblond ^(2,4)

(1) Clinique équine, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (ENVA), 7 Av du Général de Gaulle 94700 Maisons-Alfort, France

(2) Epidémiologie animale, UR 346 INRA Theix 63122 Saint Genès Champanelle, France

(3) UMR 1161 Virologie, INRA AFSSA ENVA, 23 Av du Général de Gaulle 94700 Maisons-Alfort, France

(4) Clinéquine, VetAgro Sup Campus vétérinaire de Lyon, 1 Av Bourgelat 69280 Marcy L'Etoile, France

Word Count: 3586

Number of tables: 1

Number of figures: 4

Abstract (148 words):

West Nile virus (WNV) has historically been considered to be among the least virulent members of the Japanese serogroup complex (family Flaviviridae, genus Flavivirus). WNV natural cycle involves birds as the main amplifying hosts and several species of mosquitoes as vectors. Many outbreaks occurred during the last decade, causing severe human encephalitis in the Old World. The virus has become established in many countries and there is little chance that it will be eliminated. Transmission is difficult to predict and even more difficult to prevent. In this review, we present the latest knowledge on epidemiology and clinical symptoms. Then, we focus on specific factors likely to trigger changes in the distribution of the disease in Europe, like climate changes and their consequences on the potential vectors of WNV or bird migration routes. The control of some anthropogenic and environmental factors could help preventing extension and re-emergence of epidemics.

Keywords: West Nile virus, *Flavivirus*, epidemiology, vector-borne disease, zoonose, horses, birds, mosquitoes, encephalitis.

1. Introduction

West Nile (WN) fever is a flaviviral disease transmitted in natural cycles between birds and mosquitoes, particularly *Culex* spp. (Figure 1). The virus was first isolated in 1937 from the blood of a woman of the WN district of Uganda who was suffering from a mild febrile illness (85).

In the Old World, many outbreaks, causing severe human encephalitis, have been observed : Algeria 1994 (8 fatal cases), Morocco 1996 (1 fatal case), Romania 1996 (17 fatal cases), Tunisia 1997 (8 fatal cases), Russia 1999 (40 fatal cases), Israël 2000 (33 fatal cases), France 2003 (21, 60, 82, 90). In Bucharest and Volgograd, epidemics occurred in urban areas where cellars flooded with sewage-polluted water were highly productive breeding sites for an effective vector, *Culex pipiens* (90). Outbreaks on this scale have also occurred in Israel (95) (Figure 2). Recent outbreaks have been reported in northeastern Italy in 2008 and 2009 (Emilia-Romagna, Veneto and Lombardy) : 6 human neuroinvasive cases, 1 case of WN fever and 4 WNV asymptomatic human infections associated with 32 equine cases and 5 fatalities in 2008, 16 human neuroinvasive cases and 1 fatal case in 2009 (8, 13, 33, 75) . No deaths have been reported in birds until now. WNV strains isolated from samples of equids and birds (a pigeon and 3 magpies) were much closed genetically to 1998 Tuscany WNV strain, as well as isolates from Romania, Russia, Senegal and Kenya (58, 81).

West Nile virus (WNV) was first detected in the Western Hemisphere in 1999 in New York City (35). Subsequently, WNV spread across continental USA as well as northward into Canada and southward into the Caribbean Islands and Latin America leading to unparalleled morbidity and mortality rates in humans (96). Between 1999 and 2009 in the USA, 1,164 fatal cases and 29,683 reported cases of WNV infection occurred (17). Nowadays WNV is considered as endemic throughout much of the Western Hemisphere (1).

WN disease will most probably continue to be a public-health concern. Because of the most widespread geographical distribution and the largest vector and host range of all mosquito-borne flaviviruses (96), WNV has become established in several countries and there is little chance that it will be eliminated. This paper aims at discussing factors that could lead to re-emergence in Europe.

2. Disease transmission, epidemiology and clinical symptoms

a. Molecular epidemiology

WNV belongs to the mosquito-borne viruses of the genus *Flavivirus*. Phylogenetic studies on a region of the envelop gene have shown the existence of two main lineages (9) (Figure 3) : lineage 1 includes WNV strains from Africa, Europe, the Middle East, North America, India and Australia, while lineage 2 comprises WNV strains mainly from Sub-Saharan Africa and Madagascar. European epidemics may be initiated by introduction of variants from Africa through migratory birds, although introduction from Europe to Africa cannot be ruled out. In Hungary, both lineages have been described and disease reported in wild and domestic birds, as well as in sheep and horses. In this country, lineage 2 has a remarkable pathogenicity for animals and seems to be endemic (96). Noteworthy lineage 2 WNV has been recently associated with fatal neurological cases in horses in South Africa (93).

The virus isolated in the USA in 1999 was closely related to a strain isolated in Israel a year earlier (50). Since 2003, it was recognized that a new dominant genotype had arisen (20).

Subclades of lineage 1 occur in Australia (Lineage 1b) and in India (Lineage 1c) and a distinct lineage has been identified in India (lineage 5) (10, 50). Strains isolated in central Europe and Russia were classified as new lineages of WNV (3 and 4 respectively) (3), but their taxonomic status is currently unclear. Recently in Spain, a putative new lineage of WNV was detected in a pool of *Culex pipiens* mosquitoes (91). Phylogenetic analysis is in favour of a common evolution between this Spanish strain and lineage 4 virus and both have not been associated with natural diseases in animals and humans until now.

A great diversity of WNV strains is encountered in the Old World and virulence of the newly described strains is yet poorly characterized.

b. Mosquito (Diptera: Culicidae) transmission

i. Enzootic cycle

Infectious mosquitoes carry WNV in salivary glands and infect susceptible vertebrate hosts at feeding. Vectors must feed on viraemic hosts to become infected. A temperature-dependent “extrinsic period” then ensues,

during which virus replicates and enters the salivary glands. Typically, this period lasts for 2 weeks during warm periods, but is sensitive to both temperature and humidity (18). After this period, mosquitoes can transmit the virus to susceptible hosts. In Europe and Africa, the main enzootic vectors are *Cx. pipiens*, *Cx. modestus*, *Cx. univittatus*, and *Cx. antennatus* (38, 66).

ii. Bridge Vectors and Alternative Transmission Mechanisms

Bridge vectors (distinct from enzootic vector species) ensure transmission of WNV to humans. Population density, host feeding studies (47) and genetic analyses (30) have implicated *Cx. pipiens* as the most important bridge vector in Eastern Europe (80) and Russia (31). Pioneering studies by Spielman (86) hypothesized that anautogenous populations of *Cx. pipiens* form *pipiens*, that feed exclusively on birds, could hybrid with autogenous populations of *Cx. pipiens* form *molestus* in late summer and then feed indiscriminately on either birds or mammals. *Cx. pipiens* may therefore be involved in early-season amplification of WNV in enzootic cycles and serve as bridge vectors when autogenous-anautogenous hybrids become abundant (46, 86).

iii. Long term perpetuation and spread

Potential mechanisms of WNV perpetuation within an enzootic focus include low-level continuous enzootic transmission, vertical transmission by mosquito vector(s) and chronic infection in birds (7, 49, 73). From 2000 to 2004 in the Camargue, most likely owing to local perpetuation, equine epizootics occurred accompanied by sentinel bird seroconversion (51). Enzootic activity of WNV has also been highlighted in the Camargue in free-ranging birds with the detection of seropositive birds, including juveniles, from 2005 to 2007, without any case of WN fever in horses or humans (5).

Vertical transmission of WNV in *Culex* and *Aedes* mosquitoes has been demonstrated experimentally (7) and WNV isolated from field-collected larvae *Cx. univittatus* mosquitoes in Kenya (57). Whether these low vertical transmission rates provide an effective way to perpetuate the virus remains unclear.

c. Birds, natural hosts for West Nile virus

Competent birds will sustain an infectious viraemia for 1-4 days after exposure, after which they develop life-long immunity (19). In Europe, bird mortality related to WNV infection is rare. However, in Israel and in Hungary, several storks and geese, and raptors respectively died from WNV infection (56, 97) and in North America, emergence of WNV in New York city was revealed by the death of thousands of birds (87).

In laboratory studies, Passeriformes (song birds), Charadriiformes (shorebirds), Strigiformes (owls), and Falconiformes (hawks) developed viraemia levels sufficient to infect most feeding mosquitoes (49). Some passerines, including common grackles (*Quiscalus quiscula*), various corvids (crows, jays, magpies), house finches (*Carpodacus mexicanus*) and house sparrows (*Passer domesticus*) could be important amplifying hosts, in particular in the European context (13, 42, 43).

d. Possible other transmission cycles for West Nile virus

i. Other potential amplifying hosts

Humans, horses and most other mammals are incidental or ‘dead-end’ hosts because they do not produce significant viraemia and do not contribute to the transmission cycle (12). WNV has been detected in several animals such as bats, cats, dogs, raccoons, rabbits, mountain goats, reindeers, alpacas, camels, skunks, harbour-seals, raptors, amphibians and reptiles (39, 53) . However, squirrels, eastern chipmunks (*Tamias striatus*), eastern cottontail rabbits (*Sylvilagus floridanus*) and alligators mount viraemias sufficiently high to infect at least a low proportion of mosquitoes and may be competent amplification hosts for WNV (39, 79, 89).

ii. Non viremic transmission

The possible infection of mosquitoes feeding on non-infected hosts near other infected mosquitoes has been evoked (36). This cofeeding phenomenon is well-known in ticks (72). Only 2.3% (n=87) of *Cx. quinquefasciatus* feeding with one infected mosquito on the same mice become infected (36). This transmission modality should be evaluated for other potential vectors of WNV to evaluate the importance of this mechanism.

iii. Other potential vectors

The role of non-mosquito vectors in WNV epizootiology continues to be explored. WNV has been isolated from soft ticks in Israel (59) and hippoboscid flies in the United States (28). The potential role as vectors of non-mosquito dipterans such as midges, sandflies and blackflies has not been evaluated.

iv. New routes of transmission : non-vectorial transmission

There is strong evidence for non-vector routes of transmission, as with bird-to-bird transmission through the fecal-oral route, *via* cloacal shedding and through consumption of infected carrion. Komar et al. (2003) demonstrated WNV transmission between crows in the same cage, as well as oral transmission from infected carcasses to crows (49). Direct transmission has also been demonstrated or strongly suspected for farmed alligators, domestic turkeys in Wisconsin and domestic geese in Canada (2, 15, 39).

In humans, the most important areas of concern with respect to new modes of transmission include transfusion and organ transplantation which were documented in 2002 in the USA (68). Serological studies conducted in 2000 among blood donors living in the South of France showed a significant level of WNV-IgG and IgM prevalence (32). These cases led to the implementation of comprehensive surveillance of blood donations.

Other cases of WNV contamination transplacentally, through breast milk (34) or dialysis (16) have been reported. WNV infection has also been occupationally acquired by laboratory workers or veterinarians through percutaneous inoculation and possibly through aerosol exposure, for example recently during a horse autopsy (14, 62, 92). An outbreak of WNV disease among turkey handlers at a turkey farm raised the possibility of aerosol exposure (15) and in one instance a possible WNV transmission.

e. Clinical symptoms

i. Clinical features in humans

About 80% of WNV infections in humans are apparently asymptomatic. WN Fever (WNF) presents as a minor influenza-like illness, characterized by an abrupt onset of moderate to high fever lasting 3 to 5 days (Incubation period is 3 to 6 days). A maculopapular or roseolar rash (29) appears in approximately 50% of cases, spreading from the trunk to the extremities and head. Lymphadenopathy, anorexia, nausea, abdominal

pain, diarrhea, myositis, orchitis and respiratory symptoms are also encountered (84). Hepatosplenomegaly, hepatitis, pancreatitis, myocarditis (69) and hemorrhagic fever have been reported (65).

Occasionally (<15% of cases), acute aseptic meningitis or encephalitis occurs (54, 78). Flaccid paralysis can accompany, generally without sensory loss (83). However, there have been reports of axonal polyneuropathy in which both sensory and motor neurons appear to be affected (37). A striking feature of WNV encephalitis is movement disorders, many characterised as Parkinsonism (76).

Up to one year may be necessary for convalescence following encephalitis. Myalgia, confusion and lightheadedness may persist beyond this period. Prolonged depression persists in as many as 31% of patients (61).

ii. Host risk factors

The incidence of neuro-invasive WNV disease and death increases with age. Other risk factors associated with the development of neuro-invasive disease rather than West Nile Fever included male sex, hypertension and diabetes mellitus (40). Hypertension and cerebrovascular disease presumably promote virus entry and replication in the endothelium of the blood–brain barrier. Diabetes and hypertension are both independent risk factors for increased permeability of the blood–brain barrier.

Immunocompromised humans are at greatest risk for disseminated WNV infection. The induction of a specific, neutralizing IgM response early in the course of WNV infection limits viraemia and dissemination into the central nervous system (CNS) and protects against lethal infection (22, 54).

iii. Clinical features in mammals

Following WNV infection, approximately 10% of horses present neurological disorders. Except for fever, clinical signs of WNV in horses almost exclusively reflect lesions of the CNS (Table I). Mortality rates among clinically affected horses have been estimated around 40 – 50% (64).

There is only limited information available on WNV occurrence in sheep, except for seropositivity (44). A case of a 4-year old ewe with WNV infection and neurological symptoms has been described in Hungary (45). The isolated virus belonged to lineage 2 of WNV (the highest sequence identity (99.5%) was found with a

WNV strain detected in a goshawk (*Accipiter gentilis*) that died after showing central nervous signs in Hungary in 2004) (4). These observations indicated that a tropical African strain of WNV was successfully maintained during successive years in the moderate European climate.

4. Factors triggering changes in WNV distribution

i. Factors linked to climate change and mosquito populations

As soon as 1999, Epstein suggested that a mild winter, followed by dry spring and summer seasons, hot waves in July and storms with rainfalls in the beginning of autumn would favor the emergence of mosquito-borne diseases (25). During the outbreak in Israel in 2000, the minimum temperature was found as the most important climatic factor that encouraged disease earlier appearance (67). The outbreak development was comparable in Romania (1996). Each of these epidemics appeared after a long heatwave.

Climate is vital for vector abundance, biology or physiology (77). Mosquitoes are exquisitely sensitive to weather conditions at many stages of their life cycles. The net effect of global climate change on vector-borne diseases may be positive or negative, depending on the relative contributions of variations in each of the contributory parameters. For example, it is likely that increasing temperature will lead to an increase in the vector-biting rate, but also to an increase in the mortality rate, tending to decrease transmission (77). Drought brings avian hosts and vector mosquitoes into close contact and facilitates the epizootic cycling and amplification of arboviruses within these populations (25). In the South of France, retrospective study of the 2000 outbreak showed that *Cx modestus* aggressiveness was positively correlated with the temperature and humidity coupled with rainfall and sunshine (55).

ii. Factors linked to bird populations

1) Bird movements : migration and dispersion

During migratory movements, birds carry pathogens that can be transmitted between species at breeding, wintering and stopover places where numerous birds of various species are concentrated. A list of birds potentially involved in the introduction, amplification and spread of WNV in the Camargue was recently

provided (41). Birds were classified according to their migration routes and to other ecological factors such as habitat use and abundance. For example mostly passerines and shorebirds could introduce the virus in spring from the African continent. Birds potentially involved in the spread of WNV from wet to dry areas at the end of summer could be 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.

Bird roosting behavior may be a critical component regulating WNV transmission because of the crepuscular/nocturnal feeding behavior of *Culex* mosquitoes. A study of the roosting behavior of American crows (*Corvus brachyrhynchos*) and northern cardinals (*Cardinalus cardinalis*) showed that crows could spread the virus throughout an area of around 20 km², while viremic cardinals would only spread the virus over an area of 0.03 km² on average (94).

A recent study investigates the role of migratory birds, principally Passeriformes, in the dissemination of the WNV in the USA (24). On more than 13,000 avian blood samples, specific WNV neutralizing antibodies were detected in 254 birds (39 species) and WNV viraemias identified in 19 birds only during fall migration. Migratory birds may have been the principal agent involved in the spread of WNV in the USA.

2) Host diversity and heterogeneity

Recent ideas suggest that biodiversity could play a great role in enhancing contact rates between hosts or between hosts and vectors. Ezenwa *et al.* showed that non-passerine species richness (number of non passerine species) was negatively correlated with both mosquito and human infection rates for WNV (26). Kilpatrick *et al.* showed that WNV transmission was dominated by extreme heterogeneity in the community of avian host species, with a single relatively uncommon species, American robin (*Turdus migratorius*), accounting for the majority of WNV-infectious mosquitoes (48). In Southern France (Var) in 2003, the two areas with IgM positive horses were located near protected natural zones where biodiversity is greater than elsewhere (23).

In the eastern USA, increased avian diversity was associated with a lower incidence of human WNV infection (88). This study illustrated the concept of “Dilution Effect” and show that wildlife diversity can help in

protecting human populations from infectious diseases. Where native vertebrate diversity is high, mosquito vectors can feed from a large variety of hosts, mostly poor reservoirs for the WNV, resulting in lower infection prevalence (63). Conservation of avian diversity and biodiversity in general might help the prevention of WNV epidemics.

iii. Environmental, anthropogenic changes and socio-economical patterns

The distribution of both susceptible avian reservoir hosts and competent mosquito vectors is influenced by geographic variables such as land use/landcover, elevation, human population density, physiographic region, and temperature. Identifying links between environmental variables and infectious disease risk is essential to understand how human-induced environmental changes will affect the dynamics of human and wildlife diseases.

In the Camargue, two clusters of equine WNV cases were identified after the 2004's outbreak, both in the wet area (52) (Figure 4). Rice fields, dry bushes, wet "sansouire" and open water were the major components of the landscape that were associated with the presence of cases. In the Var and the Camargue, high level viral circulation was positively associated with the landscape metrics, interspersion and juxtaposition index (IJI), as well as with the surface covered by heterogenous agricultural areas. Both variables are indicators of a complex landscape structure that may favour the contact rates of competent vectors with reservoir hosts (71).

In the Colorado, authors found that WNV infection rates among *Culex* mosquitoes declined with increasing wetland cover. These results suggest that preserving large wetland areas may represent a valuable ecosystem-based approach for controlling WNV outbreaks (27). In Northeastern United States, a study based on analysis of 8 years (1999-2006) of human WNV disease surveillance data showed that urbanization is a risk factor for the incidence of this disease, but independent of human population density (11). These results are consistent with knowledge of vector species in this area.

6. Risk prediction models

Models developed for the risk assessment of WNV emergence are either statistic or dynamic. The objective is to identify key parameters that could be included in routine surveillance systems and allow for an early warning and implementation of control measures.

a. Vector-based models of prediction

To forecast the dynamic of mosquito populations, a theoretical framework allowing the estimate calculation of the abundance dynamics of mosquitoes of the genera *Aedes* and *Culex* breeding and emerging from rain fed ponds was developed (70). The dynamic of vectorial abundance was sensitive to flooding dynamics and depended on the bio-ecology of mosquito species and the topography of breeding sites.

These models have also to take into account the capacity of flight and dispersion of the vectors (6). For example, *Culex modestus* has a low distance flight in open spaces; however, it can fly at longer distances along vegetation corridors.

b. Populations-based models

Instead of focusing on vector-population, other studies focused on the links between WNV-hosts cases (reservoirs and/or incidental, human or horses) and environment to built predictive models for the risk of transmission. This approach, mainly statistic, has the advantage to need a lower degree of knowledge about vector abundances, but the disadvantage to need WNV cases, identified thanks to the surveillance systems. So, the external validation of these models needs to be conducted.

In France, as the disease is mandatory to be reported by veterinarians, and vaccination of horses is yet very limited, a syndromic surveillance system allowed the collection of clinical cases in horses during the consecutive years. A model was built to generate a prediction map for the areas at risk of endemic circulation of WNV along the Mediterranean coast (71). Areas with significant probability of a high level viral circulation status were located in the Camargue and in the Var, but also at an intermediate distance between both zones, near Aix en Provence. Equine cases reported in 2006 near Perpignan were also located near high risk areas.

Further work is needed to provide an external validation of this predictive map and a generalization to other European countries.

7. Conclusion

The spectacular panzootic of WNV in the Americas has drawn attention to this virus and it has frequently been suggested that it is also an emerging pathogen in the Old World. Recent data suggest an increase in the circulation of WNV in European countries like Hungary, Austria and Italy. However it is important to put in perspective the fact that even if we include the urban outbreaks in Romania and Russia, less than 200 deaths in humans have been recorded over the past decade. Of course, many countries have limited facilities for surveillance and diagnosis, but there is certainly no evidence of large-scale epidemics anywhere in the region. The urban outbreaks in Romania and Volgograd were an exception, but were directly attributable to poor construction and sub-standard sanitation. Similar circumstances exist throughout the ex-Soviet Bloc countries.

Without an explanation for the erratic recrudescence of WNV, it is hard to anticipate what may happen in the future. Temperature is only one of many interacting factors that are likely to influence transmission (74). The history of Yellow fever, Dengue, Malaria, Chikungunya and other diseases in Europe shows that the risk of importation and establishment of exotic pathogens is a direct result of the revolution of transport technologies and increasing global trade. Globalization is potentially a far greater challenge to public health than any future changes in climate.

9. Acknowledgements

This review is based on an extensive literature study conducted as part of the ECDC funded V-borne project “Assessment of the magnitude and impact of vector-borne diseases in Europe”, tender n° OJ/2007/04/13-PROC/2007/003. The contents of this publication are the responsibility of the authors don't necessarily reflect the views nor of the European Centre for Disease Prevention and Control, nor of the European Commission.

References

1. Artsob H., Gubler D.J., Enria D.A., Morales M.A., Pupo M., Bunning M.L. & Dudley J.P. (2009). - West Nile Virus in the New World: Trends in the Spread and Proliferation of West Nile Virus in the Western Hemisphere. *Zoonoses Public Health*. **56**, 357-369.
2. Austin R.J., Whiting T.L., Anderson R.A. & Drobot M.A. (2004). - 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*. **45**(2), 117-123.
3. Bakonyi T., Hubalek Z., Rudolf I. & Nowotny N. (2005). - Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, Central Europe. *Emerg Infect Dis*. **11**(2), 225-231.
4. Bakonyi T., Ivanics E., Erdélyi K., Ursu K., Ferenczi E., Weissenböck H. & Nowotny N. (2006). - Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, Central Europe. *Emerg Infect Dis*. **12**(4), 618-623.
5. Balanca G., Gaidet N., Savini G., Vollot B., Foucart A., Reiter P., Boutonnier A., Lelli R. & Monicat F. (2009). - Low West Nile virus circulation in wild birds in an area of recurring outbreaks in Southern France. *Vector Borne Zoonotic Dis*. **9**(6), 737-741.
6. Balenghien T. De l'identification des vecteurs du virus West Nile à la modélisation du risque d'infection dans le sud de la France. Grenoble: J Fourier; 2006.
7. Baqar S., Hayes C.G., Murphy J.R. & Watts D.M. (1993). - Vertical transmission of West Nile virus by Culex and Aedes species mosquitoes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **48**(6), 757-762.
8. Barzon L., Squarzon L., Cattai M., Franchin E., Pagni S., Cusinato R. & Palu G. (2009). - West Nile virus infection in Veneto region, Italy, 2008-2009. *Euro Surveill*. **14**(31).
9. Berthet F.X., Zeller H.G., Drouet M.T., Rauzier J., Digoutte J.P. & Deubel V. (1997). - Extensive nucleotide changes and deletions within the envelope glycoprotein gene of Euro-African West Nile viruses. *J Gen Virol*. **78**(Pt 9), 2293-2297.
10. Bondre V., Jadi R., Mishra A., Yergolkar P. & Arankalle V. (2007). - West Nile virus isolates from India: evidence for a distinct genetic lineage. *J Gen Virol*. **88**(Pt 3), 875-884.
11. Brown H.E., Childs J.E., Diuk-Wasser M.A. & Fish D. (2008). - Ecological factors associated with West Nile virus transmission, northeastern United States. *Emerg Infect Dis*. **14**(10), 1539-1545.
12. 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. (2002). - Experimental infection of horses with West Nile virus. *Emerg Infect Dis*. **8**(4), 380-386.
13. Calistri P., Giovannini A., Savini G., Monaco F., Bonfanti L., Ceolin C., Terregino C., Tamba M., Cordioli P. & Lelli R. (2009). - West Nile Virus Transmission in 2008 in North-Eastern Italy. *Zoonoses Public Health*.
14. CDC. (2002). - Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory-acquired West Nile virus infections - United States, 2002. *Morb Mortal Wkly Rep*. **51**(50), 1133-1135.
15. CDC. (2003). - Centers for Disease Control and Prevention. West Nile virus infection among turkey breeder farm workers - Wisconsin, 2002. *Morb Mortal Wkly Rep*. **52**(42), 1017-1019.
16. CDC. (2004). - Centers for Disease Control and Prevention. Possible dialysis-related West Nile virus transmission - Georgia, 2003. *Morb Mortal Wkly Rep*. **53**(32), 738-739.
17. CDC (2010). - Statistics, surveillance and control of West Nile Virus. [Web Page]. Available from: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/surv&control.htm> [cited 2010 April 16th]
18. Cornel A., PG J. & Blackburn N. (1993). - Environmental temperature on the vector competence of Culex univittatus (Diptera: culicidae) for West Nile virus. *J Med Entomol*. **30**(2), 449-456.
19. Dauphin G., Zientara S., Zeller H. & Murgue B. (2004). - West Nile: worldwide current situation in animals and humans. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. **27**(5), 343-355.

20. Davis C., Ebel G., Lanciotti R., Brault A. & Guzman H. (2005). - Phylogenetic analysis of North American West Nile virus isolates, 2001-2004: evidence for the emergence of a dominant genotype. *Virology*. **342**(2), 252-265.
21. Del Giudice P., Schuffenecker I., Vandenbos F., Counillon E. & Zeller H. (2004). - Human West Nile virus, France. *Emerg Infect Dis*. **10**(10), 1885-1886.
22. Diamond M.S., Shrestha B., Mehlhop E., Sitati E. & Engle M. (2003). - Innate and adaptive immune responses determine protection against disseminated infection by West Nile encephalitis virus. *Viral Immunology*. **16**(3), 259-278.
23. Durand B., Dauphin G., Zeller H., Labie J., Schuffenecker I., Murri S., Moutou F. & Zientara S. (2005). - Serosurvey for West Nile virus in horses in southern France. *Vet Rec*. **157**(22), 711-713.
24. Dusek R.J., McLean R.G., Kramer L.D., Ubico S.R., Dupuis A.P., 2nd, Ebel G.D. & Guptill S.C. (2009). - Prevalence of West Nile virus in migratory birds during spring and fall migration. *Am J Trop Med Hyg*. **81**(6), 1151-1158.
25. Epstein P.R. (2001). - West Nile virus and the climate. *J Urban Health*. **78**(2), 367-371.
26. Ezenwa V.O., Godsey M.S., King R.J. & Guptill S.C. (2006). - Avian diversity and West Nile virus: testing associations between biodiversity and infectious disease risk. *Proc Biol Sci*. **273**(1582), 109-117.
27. Ezenwa V.O., Milheim L.E., Coffey M.F., Godsey M.S., King R.J. & Guptill S.C. (2007). - Land cover variation and West Nile virus prevalence: patterns, processes and implications for disease control. *Vect Borne Zoon Dis*. **7**(2), 173-180.
28. Farajollahi A., Crans W., Nickerson D., Bryant P. & Wolf B. (2005). - Detection of West Nile virus RNA from the louse fly *Icosta americana* (Diptera: Hippoboscidae). *J Am Mosq Control Assoc*. **21**(4), 474-476.
29. Ferguson D., Gershman K., LeBailly A. & Petersen L. (2005). - Characteristics of the rash associated with West Nile virus fever. *Clin Infect Dis*. **41**(8), 1204-1207.
30. Fonseca D., Keyghobadi N., Malcolm C., Mehmet C. & Schaffner F. (2004). - Emerging vectors in the *Culex pipiens* complex. *Science*. **303**(5663), 1535-1538.
31. Fyodorova M., Savage H., Lopatina J., Bulgakova T. & Ivanitsky A. (2006). - Evaluation of potential West Nile virus vectors in Volgograd region, Russia, 2003 (Diptera: Culicidae): species composition, bloodmeal host utilization, and virus infection rates of mosquitoes. *J Med Entomol*. **43**(3), 552-563.
32. Gallian P., de Lamballerie X., de Micco P. & Andreu G. (2005). - [West Nile Virus: implication and generalities in blood transfusion]. *Transfusion Clinique et Biologique*. **12**(1), 11-17.
33. Gobbi F., Napoletano G., Piovesan C., Russo F., Angheben A., Rossanese A., Cattelan A.M., Gallo L., Valsecchi M., Piazza A., Venturi G. & Bisoffi Z. (2009). - Where is West Nile fever? Lessons learnt from recent human cases in northern Italy. *Euro Surveill*. **14**(10).
34. Hayes E. & O'Leary D. (2004). - West Nile virus infection: a pediatric perspective. *Pediatrics*. **113**(5), 1375-1381.
35. Hayes E., Komar N., Nasci R., Montgomery S., O'Leary D. & Campbell G. (2005). - Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis*. **11**(8), 1167-1173.
36. Higgs S., Schneider B., Vanlandingham D., Kingler K. & Gould E. (2005). - Nonviremic transmission of West Nile virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. **102**(25), 8871-8874.
37. Holman R., Monserrate N., Czander E. & Rushing E. (2004). - West Nile poliomyelitis. *Emerg Infect Dis*. **10**(3), 547-548.
38. Hubalek Z. & Halouzka J. (1999). - West Nile fever—a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis*. **5**(5), 643-650.
39. Jacobson E., Ginn P., Troutman J., Farina L., Stark L. & Klenk K. (2005). - West Nile virus infection in farmed American alligators (*Alligator mississippiensis*) in Florida. *J Wildl Dis*. **41**(1), 96-106.

40. Jean C.M., Honarmand S., Louie J.K. & Glaser C.A. (2007). - Risk factors for West Nile virus neuroinvasive disease, California, 2005. *Emerg Infect Dis.* **13**(12), 1918-1920.
41. Jourdain E., Toussaint Y., Leblond A., Bicout D.J., Sabatier P. & Gauthier-Clerc M. (2007). - 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.* **7**(1), 15-33.
42. Jourdain E., Gauthier-Clerc M., Sabatier P., Grege O., Greenland T., Leblond A., Lafaye M. & Zeller H.G. (2008). - Magpies as hosts for West Nile virus, southern France. *Emerg Infect Dis.* **14**(1), 158-160.
43. Jourdain E., Schuffenecker I., Korimbocus J., Reynard S., Murri S., Kayser Y., Gauthier-Clerc M., Sabatier P. & Zeller H.G. (2007). - West Nile virus in wild resident birds, Southern France, 2004. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **7**(3), 448-452.
44. Juricova Z., Mitterpack J., Prokopic J. & Hubalek Z. (1986). - Circulation of mosquito-borne viruses in large-scale sheep farms in eastern Slovakia. . *Folia Parasitologica.* **33**, 285-288.
45. Kecskeméti S., Bajmocy E., Bacsadi A., Kiss I. & Bakonyi. (2007). - Encephalitis due to West Nile virus in a sheep. *Vet Record.* **161**(16), 568-569.
46. Kilpatrick A., Kramer L., Campbell G., Alleyne E.D., AP & Daszak P. (2005). - West Nile virus risk assessment and the bridge vector paradigm. *Emerg Infect Dis.* **11**(3), 425.
47. Kilpatrick A., Kramer L., Jones M., Marra P. & Daszak P. (2006). - West Nile virus epidemics in North America are driven by shifts in mosquito feeding behaviour. *PLoS Biology.* **4**(4), e82.
48. Kilpatrick A., Daszak P., Jones M., Marra P. & Kramer L. (2006). - Host heterogeneity dominates West Nile virus transmission. *Proc Biol Sci.* **273**(1599), 2327-2333.
49. Komar N., Langevin S., Hinten S., Nemeth N., Edwards E., Hettler D., Davis B., Bowen R. & Bunning M. (2003). - Experimental infection of North American birds with the New York 1999 Strain of West Nile virus. *Emerg Infect Dis.* **9**(3), 311-322.
50. Lanciotti R., Ebel G., Deubel V., Kerst A. & Murri S. (2002). - Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East. *Virology.* **298**(1), 96-105.
51. Leblond A., Hendrikx P. & Sabatier P. (2007). - West Nile virus outbreak detection using syndromic monitoring in horses. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **7**(3), 403-410.
52. Leblond A., Sandoz A., Lefebvre G., Zeller H. & Bicout D.J. (2007). - Remote sensing-based identification of environmental risk factors associated with West Nile disease in horses in Camargue, France. . *Prev Vet Med.* **79**(1), 20-31.
53. Lichtensteiger C., Heinz-Taheny K., Osborne T., Novak R., Lewis B. & Firth M. (2003). - West Nile virus encephalitis and myocarditis in wolf and dog. *Emerg Infect Dis.* **9**, 1303-1306.
54. Lindsey N.P., Staples J.E., Lehman J.A. & Fischer M. (2010). - Surveillance for human West Nile virus disease - United States, 1999-2008. *MMWR Surveill Summ.* **59**(2), 1-17.
55. Ludwig A., Bicout D.J., Chalvet-Monfray K. & Sabatier P. (2005). - Modélisation de l'agressivité de *Culex modestus*, vecteur potentiel de West Nile en Camargue, en fonction de données météorologiques. *Environnement, Risques et Santé.* **4**(2), 1-5.
56. Malkinson M. & Banet C. (2002). - The role of birds in the ecology of West Nile virus in Europe and Africa. *Current Topics Microbiol Immunol.* **267**, 309-322.
57. Miller B.M., Nasci R., Godsey M.S., Savage H.M., Lutwama J.J., Lanciotti R. & Peters C.J. (2000). - 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**(2), 240-246.
58. Monaco F., Lelli R., Teodori L., Pinoni C., Di Gennaro A., Polci A., Calistri P. & Savini G. (2009). - Re-Emergence of West Nile Virus in Italy. *Zoonoses Public Health.*

59. Mumcuoglu K., Banet-Noach C., Malkinson M., Shalom U. & Galun R. (2005). - Argasid ticks as possible vectors of West Nile virus in Israel. *Vect Borne Zoon Dis.* **5**(1), 65-71.
60. Murgue B., Murri S., Zientara S., Durand B., Durand J.P. & Zeller H.G. (2001). - West Nile outbreak in horses in Southern France, 2000: the return after 35 years. *Emerg Infect Dis.* **7**(4), 692-696.
61. Murray K., Resnick M. & Miller V. (2007). - Depression after infection with West Nile virus. *Emerg Infect Dis.* **13**(3), 479-481.
62. Nir Y., Beemer A. & Goldwasser R. (1965). - West Nile virus infection in mice following exposure to a viral aerosol. *Br J Exp Pathol.* **46**(4), 443-449.
63. Ostfeld R.S. (2009). - Biodiversity loss and the rise of zoonotic pathogens. *Clin Microbiol Infect.* **15 Suppl 1**, 40-43.
64. Ostlund E.N., Crom R.L., Pedersen D.D., Johnson D.J., Williams W.O. & Schmitt B.J. (2001). - Equine West Nile encephalitis, United States. *Emerg Infect Dis.* **7**(4), 665-669.
65. Paddock C., Nicholson W., Bhatnagar J., Goldsmith C., Greer P., Hayes E., Risko J., Henderson C., Blackmore C., Lanciotti R., Campbell G. & Zaki S. (2006). - Fatal hemorrhagic fever caused by West Nile virus in the United States. *Clin Infect Dis.* **42**(11), 1527-1535.
66. Panthier R. (1968). - [Epidemiology of the West Nile virus: study of an outbreak in Camargue. I. Introduction]. *Ann Inst Pasteur (Paris).* **114**(4), 518-520.
67. Paz S. (2006). - The West Nile virus outbreak in Israel (2000) from a new perspective: the regional impact of climate change. *Int J Environ Health Res.* **16**(1), 1-13.
68. Pealer L., Marfin A. & Petersen L. (2003). - Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002. *N Engl J Med.* **349**(13), 1236-1245.
69. Pergam S., DeLong C., Echevarria L., Scully G. & Goade D. (2006). - Myocarditis in West Nile Virus infection. *Am J Trop Med Hyg.* **75**(6), 1232-1233.
70. Porphyre T., Bicot D.J. & Sabatier P. (2005). - Modelling the abundance of mosquito vectors versus flooding dynamics. *Ecol Modelling.* **183**(2-3), 173-181.
71. Pradier S., Leblond A. & Durand B. (2008). - Land cover, landscape structure and West Nile virus circulation in southern France. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **8**(2), 253-263.
72. Randolph S., Gern L. & Nuttall P. (1996). - Co-feeding ticks: epidemiology significance for tick-borne of pathogen transmission. *Parasitol Today.* **12**(12), 472-479.
73. Reisen W., Fang Y., Lothrop H., Martinez V., Wilson J., Oconnor P., Carney R., Cahoon-Young B., Shafil M. & Brault A. (2006). - Overwintering of West Nile virus in southern California. *J Med Entomol.* **43**(2), 344-355.
74. Reiter P. (2001). - Climate change and mosquito-borne disease. *Environ Health Perspect.* **109 Suppl 1**, 141-161.
75. Rizzo C., Vescio F., Declich S., Finarelli A.C., Macini P., Mattivi A., Rossini G., Piovesan C., Barzon L., Palu G., Gobbi F., Macchi L., Pavan A., Magurano F., Ciufolini M.G., Nicoletti L., Salmaso S. & Rezza G. (2009). - West Nile virus transmission with human cases in Italy, August - September 2009. *Euro Surveill.* **14**(40).
76. Robinson R., Shahida S., Madan N., Rao S. & Khardori N. (2003). - Transient parkinsonism in West Nile virus encephalitis. *Am J Med.* **115**(3), 252-253.
77. Rogers D. & Randolph S. (2006). - Climate change and vector-borne diseases. *Adv Parasitol.* **62**, 346-381.
78. Roos K. (2004). - West Nile encephalitis and myelitis. *Curr Opin Neurol.* **17**, 343-346.
79. Root J., Oesterle P., Nemeth N., Klenk K. & Gould D. (2006). - Experimental infection of fox squirrels (*Sciurus niger*) with West Nile virus. *Am J Trop Med Hyg.* **75**(4), 697-701.

80. Savage H.M., Ceianu C., Nicolescu G., Karabatsos N., Lanciotti R., Vladimirescu A., Laiv L., Ungureanu A., Romanca C. & Tsai T.F. (1999). - 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.* **61**(4), 600-611.
81. Savini G., Monaco F., Calistri P. & Lelli R. (2008). - Phylogenetic analysis of West Nile virus isolated in Italy in 2008. *Euro Surveill.* **13**(48).
82. Schuffenecker I., Peyrefitte C., El Harrak M., Murri S., Leblond A. & Zeller H. (2004). - Re-emergence of West Nile virus (WNV) in Morocco in 2003 : evidence for genetic stability of the WNV strains involved in equine outbreaks in the Western Mediterranean basin. *Emerg Infect Dis.* **11**(2), 306-309.
83. Sejvar J., Bode A., Marfin A., Campbell G., Ewing D., Mazowiecki M., Pavot P., Schmitt J., Pape J., Biggerstaff B. & Petersen L. (2005). - West Nile virus-associated flaccid paralysis. *Emerg Infect Dis.* **11**(7), 1021-1027.
84. Smith R.D., Konoplev S., DeCourten Myers G. & Brown T. (2004). - West Nile virus encephalitis with myositis and orchitis. *Human Pathol.* **35**(2), 254-258.
85. Smithburn K.C., Hughes T.P., Burke A.W. & Paul J.H. (1940). - A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am J Trop Med Hygiene.* **20**, 471-492.
86. Spielman A. (2001). - Structure and seasonality of nearctic *Culex pipiens* populations. *Ann NY Acad Sci.* **951**, 220-234.
87. Steele K.E., Linn M.J., Schoepp R.J., Komar N., Geisbert T.W., Manduca R.M., Calle P.P., Raphael B.L., Clippinger T.L., Larsen T., Smith J., Lanciotti R.S., Panella N.A. & McNamara T.S. (2000). - Pathology of fatal West Nile virus infections in native and exotic birds during the 1999 outbreak in New York City, New York. *Vet Pathol.* **37**(3), 208-224.
88. Swaddle J.P. & Calos S.E. (2008). - Increased avian diversity is associated with lower incidence of human West Nile infection: observation of the dilution effect. *PLoS One.* **3**(6), e2488.
89. Tiawsirisup S., Platt K., Tucker B. & Rowley W. (2005). - Eastern cottontail rabbits (*Sylvilagus floridanus*) develop West Nile virus viraemias sufficient for infecting select mosquito species. *Vect Borne Zoon Dis.* **5**(1), 342-350.
90. Tsai T.F., Popovici F., Cernescu C., Campbell G.L. & Nedelcu N.I. (1998). - West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet.* **352**(9130), 767-771.
91. Vazquez A., Sanchez-Seco M.P., Ruiz S., Molero F., Hernandez L., Moreno J., Magallanes A., Tejedor C.G. & Tenorio A. (2010). - Putative new lineage of west nile virus, Spain. *Emerg Infect Dis.* **16**(3), 549-552.
92. Venter M., Steyl J., Human S., Weyer J., Zaayman D., Blumberg L., Leman P., Paweska J. & Swanepoel R. (2010). - Transmission of West Nile virus during horse autopsy *Emerg Infect Dis.* **16**(3), 573-575.
93. Venter M., Human S., Zaayman D., Gerdes G.H., Williams J., Steyl J., Leman P.A., Paweska J.T., Setzkorn H., Rous G., Murray S., Parker R., Donnellan C. & Swanepoel R. (2009). - Lineage 2 west nile virus as cause of fatal neurologic disease in horses, South Africa. *Emerg Infect Dis.* **15**(6), 877-884.
94. Ward M., Raim A., Yaremich-Hamer S., Lampman R. & Novak R. (2006). - Does the roosting behaviour of birds affect transmission dynamics of West Nile virus ? *Am J Trop Med Hyg.* **75**(2), 350-355.
95. Weinberger M. & Pitlik S. (2001). - West Nile fever outbreak, Israel, 2000: epidemiologic aspects. *Emerg Infect Dis.* **7**(4), 686-691.
96. Weissenböck H., Hubalek Z., Bakonyi T. & Nowotny N. (2010). - Zoonotic mosquito-borne flaviviruses: worldwide presence of agents with proven pathogenicity and potential candidates of future emerging diseases. *Vet Microbiol.* **140**(3-4), 271-280.
97. Wunschmann A., Shivers J., Bender J., Carroll L., Fuller S., Saggese M., van Wettere A. & Redig P. (2005). - Pathologic and immunohistochemical findings in goshawks (*Accipiter gentilis*) and great horned owls (*Bubo virginianus*) naturally infected with West Nile virus. *Avian Dis.* **49**(2), 252-259.

Table I: Clinical signs recorded in horses diagnosed with WNV disease in Camargue, France, 2000 and 2004 (60)

Clinical signs	No. confirmed cases in 2000 (76 horses)	No. confirmed cases in 2004 (32 horses)	Remarks
Ataxia	55 (72 %)	20 (63 %)	Forelimbs 2, hind limbs 2, hind and forelimbs 1, not specified 70
Abnormal behaviour	11 (15 %)	11 (34 %)	Hyperesthesia 12, teeth grinding 6, hydrophobia 1, anxiousness 1, circle walking 1, others 2
Paresis, paralysis	36 (47 %)	11 (34 %)	
Muscular tremors, myoclonia	7 (9 %)	10 (31 %)	Generalized tremors 14, local (lips, eyelid) 1, trismus, myoclonia 2
Hyperthermia (>38.5°C)	47 (62 %)	9 (28 %)	
Anorexia, lethargy		8 (25 %)	
Cranial nerve deficits		6 (19 %)	Blindness 2, dysphagia 4, facial paralysis 2
Others	1	9 (28 %)	Colic 2, lameness 3, cervical orthoracipain 2, anemia 2, glossitis 3, hepatitis 1

Legend of figures:

Figure 1: Basic WNV transmission cycle

Figure 2: Geographical distribution of WNV in the Old World

Countries in Red = **confirmed** human cases of WNV

Countries in Yellow = WNV antibodies in vertebrates

Figure 3: Phylogenetic tree of WNV

Phylogenetic tree based on the complete genomic sequence of WNV strains; GenBank accession numbers are indicated on tree branches for each viral strain. The tree was constructed with the program MEGA by neighbour-joining. Bootstrap confidence level (1000 replicates) and a confidence probability value based on the standard error test were calculated using MEGA.

Figure 4:

Results of serological, clinical and environmental studies conducted on WNV circulation in horses in Camargue, France, 2003 - 04

- a) Results of a survey conducted in equine population in Camargue, 2003: location of stables according to the presence/absence of IgG-positive horses.
- b) Results of a survey conducted in equine population in Camargue, 2003: resultant spatial prevalence-map; white areas indicate a high IgG-WNV-prevalence (80%) (except for the white area in the north that is an artefact due to a border-effect)
- c) 2004 WN outbreak in horses in Camargue, France: location of positive and negative IgM-stables for WNV disease and analysis of environmental risk factors thanks to a SPOT-4 image

Figure 1: Basic WNV transmission cycle

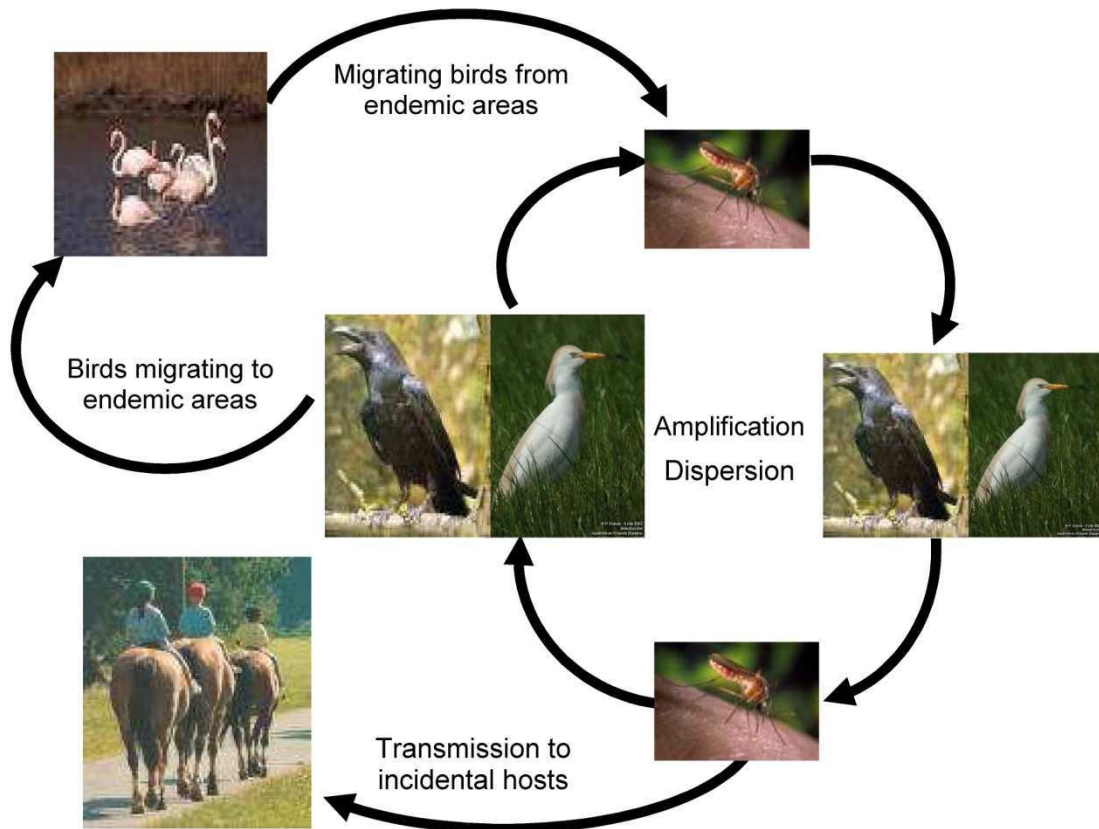
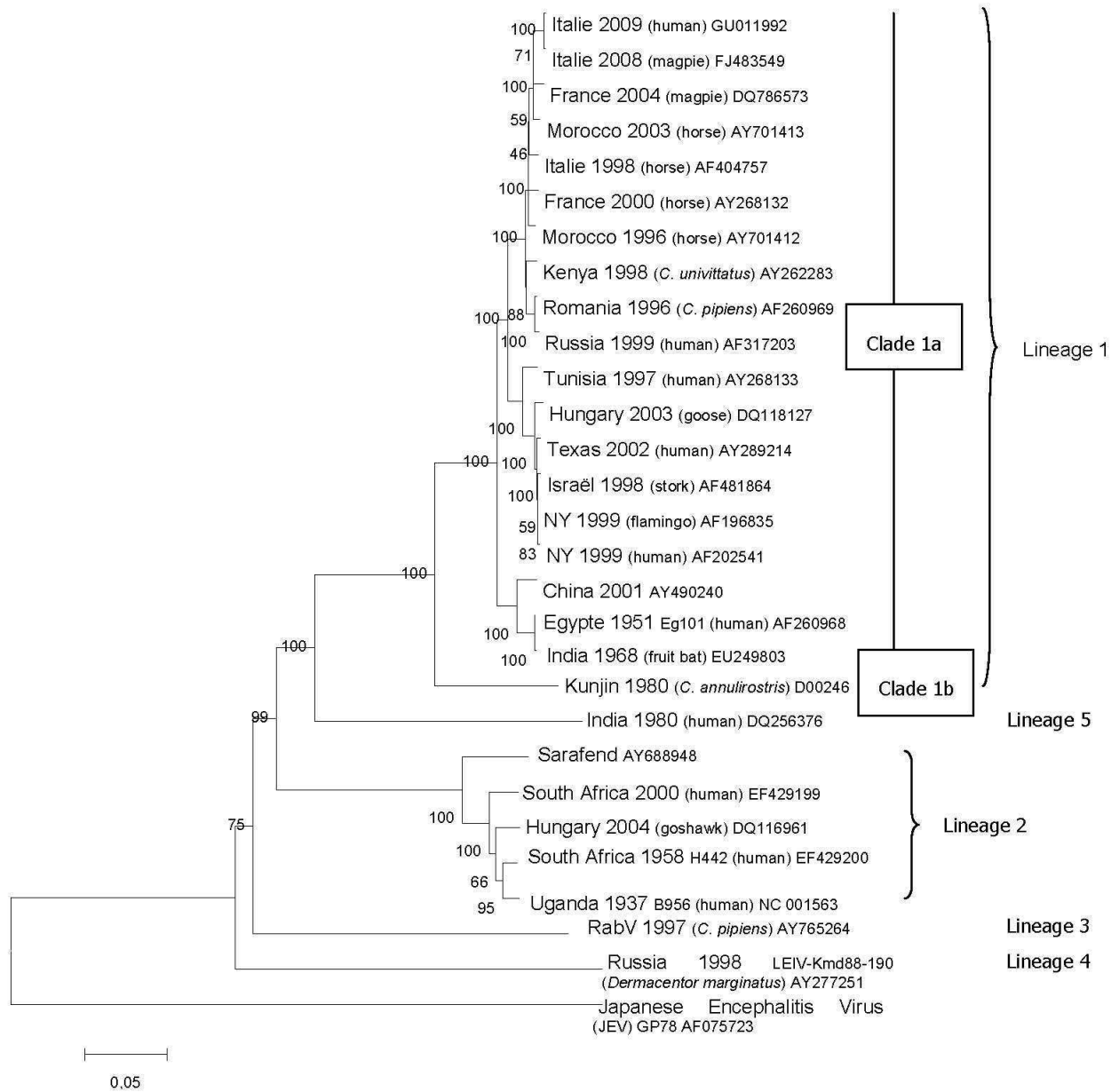


Figure 2: Geographical distribution of WNV in the Old World



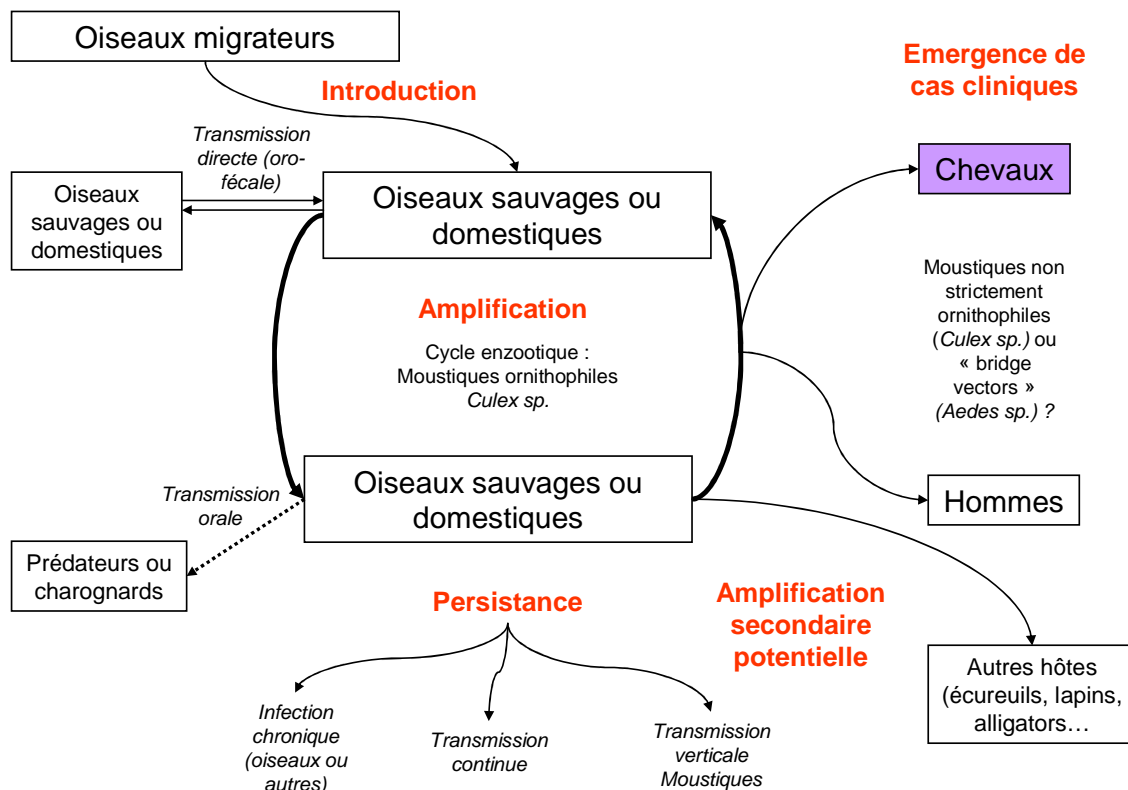
Figure 3: Phylogenetic tree of the WNV



3. Conclusion

Les questions sur l'épidémiologie du virus WN encore à résoudre sont multiples. La figure 1 présente les différents cycles de transmission du virus WN actuellement admis ou formulés par les auteurs. Pour comprendre les mécanismes d'émergence, il faut s'intéresser aux mécanismes d'introduction, d'amplification et de persistance du virus dans une zone donnée.

Figure 2: Schéma des cycles de transmission du virus West Nile



D'après Balenghien 2006

L'introduction et la circulation du virus dans le Monde semblent être essentiellement attribuables aux oiseaux migrateurs. Pour transmettre l'infection à d'autres oiseaux sur les lieux de passage ou à leur arrivée, les oiseaux infectés doivent être encore en cours de virémie. Le stress physiologique de la migration pourrait entraîner une durée de virémie plus longue, ainsi qu'une potentielle réactivation virale lors d'infection chronique.

Certains auteurs ont également émis l'hypothèse d'une persistance du virus dans des tiques infectées fixées sur l'oiseau migrateur. Même si cette hypothèse est séduisante, il paraît raisonnable de la rejeter puisque les seules tiques, dont le repas sanguin dure quelques jours,

sont les *Ixodidae*, pour lesquelles la compétence vectorielle n'a jamais été établie (Balenghien 2006, Reisen et al. 2007b).

L'introduction par l'entrée frauduleuse ou commerciale d'oiseaux infectés est suspectée également, surtout de l'Ancien vers le Nouveau Monde.

Pour le maintien du virus, il existe de nombreux pays tempérés dans lesquels le virus semble persister au cours de l'hiver, puisque des épidémies ou épizooties peuvent se produire plusieurs années successives au même endroit, comme par exemple aux Etats-Unis depuis 1999, en Roumanie en 1996 (Cernescu et al. 2000), en France en 1962 (Panthier 1968) ou plus récemment en Italie depuis 2008 (Rizzo et al. 2009). De plus les souches isolées au même endroit mais pendant des épidémies différentes sont souvent très proches d'un point de vue phylogénétique.

Les hypothèses pour expliquer cette persistance locale d'une année sur l'autre sont aujourd'hui encore très discutées. A l'heure actuelle, il est très probable que plusieurs mécanismes coexistent, leur importance relative pouvant varier en fonction des zones étudiées.

Les cycles épidémiologiques du virus WN sont extrêmement complexes et peuvent varier en fonction des souches virales, des populations de vecteurs et d'hôtes et enfin de l'environnement. La contribution relative des oiseaux en particulier à ces cycles de transmission est encore très mal connue et il est certain qu'elle varie en fonction de la zone géographique considérée. Les vecteurs sont mieux connus, en particulier grâce aux travaux de Balenghien en 2006 (Balenghien 2006). Il est donc clair qu'une étude locale des foyers de circulation du virus est nécessaire pour comprendre les mécanismes de transmission dans la zone géographique concernée. C'est pourquoi, bien que de nombreuses publications existent déjà et paraissent régulièrement dans ce domaine aux Etats-Unis, une étude du virus WN dans le bassin méditerranéen français est indispensable.

B. Situation du virus West Nile en France

1. Historique du virus West Nile en France

L'historique du virus WN, sa découverte en Ouganda en 1937, son étude épidémiologique en Egypte dans les années 1950, remarquable par la compréhension précoce des cycles de transmission du virus (Taylor et al. 1953, Hurlbut et al. 1956), puis son évolution dans le Monde, ont été récemment décrites par plusieurs auteurs (Hubalek et al. 1999, Dauphin et al. 2004, Balenghien 2006).

En France, l'histoire du virus WN a commencé dès les années 1960 dans le sud du pays. Un groupe d'étude pluridisciplinaire a été constitué de vétérinaires de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon (ENVL), de membres de l'Institut Pasteur de Paris, de chercheurs de l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) et d'entomologistes de l'ORSTOM (renommé en 1998 IRD, Institut de Recherche pour le Développement). Ce groupe a été chargé de mener une recherche systématique sur les Arbovirus en France, pays en apparence indemne d'arboviroses (Panthier 1968). Ce travail était justifié à l'époque par plusieurs raisons :

- une évolution rapide des connaissances dans ce domaine,
- la découverte que ces arbovirus peuvent s'amplifier et diffuser de façon silencieuse, sans que les manifestations cliniques chez les Mammifères ne soient très fréquentes,
- le fait que si des cas cliniques humains ou animaux surviennent, le diagnostic étiologique est pratiquement impossible à établir cliniquement,
- la découverte à cette époque que plus de 200 espèces d'arbovirus se distribuent déjà largement dans le Monde.

De plus ces arbovirus présentent un danger non négligeable pour la santé publique. Ainsi un laboratoire spécialisé de confinement a été annexé à l'Institut Pasteur à Paris et une étude sérologique a été réalisée chez l'Homme dans plusieurs régions de France en janvier 1963. Dans la basse vallée du Rhône, il est apparu que la population locale possédait des anticorps contre les arbovirus du Groupe B. Dans la classification de Casals, le Groupe B comprenait à l'époque les virus suivants : le Virus de la Fièvre Jaune, le Virus Dengue I, le Virus de l'Encéphalite d'Europe Centrale, le Virus N'Taya, le Virus Murray Valley, le virus Saint-

Louis et enfin le virus WN. En juin 1963, les enquêtes de terrain ont ainsi commencé en Camargue.

En parallèle, le laboratoire a reçu des sérums de patients du Languedoc, hospitalisés à Montpellier pendant l'été 1962 pour encéphalite grave (Panthier 1968). Ces sérums contenaient également des anticorps contre les arbovirus du Groupe B. Les enquêteurs ont alors interrogé les vétérinaires et médecins locaux, qui ont fait part de nombreux cas graves d'encéphalites chez l'Homme et le Cheval dans la région pendant cet été 1962. Enfin parmi les sérums récoltés en 1963, une séroconversion pour les arbovirus du Groupe B a été détectée sur une patiente originaire de Camargue et hospitalisée à Arles pour fièvre et « réaction méningée ».

Il a alors été décidé d'effectuer une enquête approfondie en Camargue, delta du Rhône contenant une réserve naturelle autour de l'Etang du Vaccarès et région non démoustiquée contrairement au Bas-Languedoc à l'époque. Cet environnement paraissait idéal pour la circulation et donc l'étude des arbovirus. Cette mission de terrain a permis de débiter les études sur le virus WN en particulier, dans la région.

Chez l'Homme dès 1935 et jusqu'en 1942, plusieurs types de syndromes grippaux estivaux, de courte durée et bénins, ont été rapportés par les cliniciens de la région de Montpellier, Mauguio et Lunel (Hérault), mais attribués à l'époque à la leishmaniose, anciennement appelée « fièvre à phlébotomes » (Rispe 1941, Janbon et al. 1942). Panthier et coll. en 1968 ont remis en cause ce diagnostic et ont formulé l'hypothèse d'une circulation du virus WN, pouvant expliquer ces cas (Panthier et al. 1968). Ils ont effectué des enquêtes sérologiques dans la population humaine de la région et l'analyse de sérums de cas humains d'encéphalites. En 1964, le virus WN a été isolé chez des cas cliniques humains et chez des moustiques *Culex modestus* capturés à la même époque. Panthier et coll en 1968 ont également effectué une étude clinique détaillée sur 13 cas humains de maladie de WN (dont un décès) de 1962 à 1964. Ces cas ont été confirmés par isolement viral sur deux entomologistes et par séroconversion pour les autres patients (Panthier et al. 1968). D'un point de vue spatial, les cas étaient situés en 1962-63 assez largement sur le pourtour méditerranéen (au Nord Remoulins, à l'Ouest Béziers et Agde) et en 1964, ils restèrent concentrés en Camargue, probablement grâce à la démoustication du reste du littoral d'après les auteurs (Panthier et al. 1968). A l'époque, les auteurs suspectaient déjà la participation

d'un autre vecteur que *C. modestus* en 1962-63 pour expliquer les cas hors de la zone de présence de ce moustique : *C. pipiens* ou une tique.

Chez le cheval, depuis longtemps, il était observé dans la région des cas de « lourdiges » dans la population équine, terme vétérinaire employé pour désigner tout syndrome neurologique avec ataxie et parésie postérieures. Le cheval atteint avait une démarche ébrieuse et « lourde », d'où le terme utilisé dans la région et issu du provençal (Joubert et al. 1970b). Ces cas étaient attribués à une « grippe d'été » ou une « dengue », termes regroupant des affections virales d'étiologie variée et indéterminée par les vétérinaires de l'époque. Les chevaux semi-sauvages étaient souvent retrouvés noyés dans les « roubines » et l'hypothèse avancée était une intoxication par l'herbe chargée excessivement de sel dans certaines circonstances climatiques et dans des lieux particuliers. En 1963, de nombreux cas de « lourdiges » survenus l'été précédent ont été rapportés aux membres de l'enquête de terrain par les vétérinaires locaux (Joubert et al. 1970b). Au lieu d'être cantonnés au seul delta du Rhône, ces cas survenaient bien au-delà des terres salées, dans les vignes. Une autre explication en accord avec les observations chez l'Homme au même moment a été recherchée. Des enquêtes cliniques et sérologiques ont été menées chez le cheval.

L'enquête clinique en 1963-64, consistant en une visite systématique des écuries de Camargue et de la région de Beaucaire, a permis de constater qu'une trentaine de cas de méningo-encéphalites était survenue pendant l'été 1962 autour des étangs et marais de Camargue (Joubert et al. 1970b) (Carte 1). Les chevaux atteints présentaient une ataxie et parésie postérieures, évoluant vers la mort après un décubitus ou bien la guérison, souvent accompagnée de séquelles (amaurose, ataxie persistante...). Il est très possible que bon nombre d'autres cas soient passés inaperçus, étant donné le mode de vie des chevaux dans la zone. Dans la région de Beaucaire (Carte 1), les renseignements sont plus précis : la morbidité était de 10 % environ, soit 50 cas, sans distinction d'âge, race et activité des chevaux atteints et la létalité était entre 25 et 30 % (Joubert et al. 1970b). L'épizootie s'était déroulée de juillet à octobre avec un pic de mi-août à mi-septembre. Les signes cliniques observés étaient très proches de ceux rapportés en Camargue.

Carte 1: Le virus West Nile en Camargue 1962-2004



- Cas équins WN 1962 en Camargue (Joubert et al 1970)
- Cas équins WN 1962 dans la région de Beaucaire (Joubert et al 1970)
- "Epicentre" des cas équins WN en 2000 (Durand et al 2002)
- "Epicentre" des cas équins WN en 2004 (Leblond et al 2007)
- Séroconversions des oiseaux sentinelles en 2004 (Hars et al 2005)

L'enquête sérologique de 1963 a concerné 47 chevaux vivant en plein air dans un triangle Beaucaire/Saintes Maries de la Mer/Port-Saint-Louis : 6 dans la région de Beaucaire et 41 en Camargue. Dix de ces chevaux ont présenté des signes de « lourdiges ». Trente sérums témoin de chevaux vivant en région lyonnaise et parisienne ont également été récoltés. Le choix des écuries et des chevaux n'a pas été précisément décrit. Des anticorps contre les 12 principaux arbovirus connus à l'époque (Chikungunya, Fièvre Jaune, West Nile, Tahyna...) ont été recherchés par inhibition de l'hémagglutination (IHA), révélant un contact récent. Une séroneutralisation (SN) sur souris vis-à-vis de WN, test plus spécifique que le précédent, a été effectuée (Joubert et al. 1970b). Les 30 sérums témoin étaient négatifs pour tous les tests. Les 47 sérums de la zone d'étude étaient tous négatifs pour 9 arbovirus. Seuls les virus WN, Tahyna et Saint Louis ont révélé une positivité en IHA sur ces sérums. Quatre sérums sur 47 étaient positifs pour WN, 21 sur 47 pour Saint Louis, mais à des titres faibles et sans concordance avec les signes cliniques observés sur certains chevaux. En SN, 12 chevaux sur 47 étaient positifs pour WN : 6 chevaux séropositifs sur 10 ayant été malades contre 6 sur 37 chevaux sains. Cette enquête a permis de constater que tous les chevaux ayant été malades en 1962 n'ont pas été atteints par le virus WN et que d'autres arbovirus circulaient dans la zone d'étude, renforçant l'idée que le diagnostic étiologique basé sur la clinique est impossible. D'autre part, il est démontré dès 1963 que le virus WN circule dans la zone d'étude sans entraîner systématiquement une infection apparente.

Il faut attendre septembre 1965 pour qu'une souche virale de WN soit isolée en Camargue chez une pouliche Camargue de 6 mois, atteinte de méningo-encéphalomyélite. Elle vivait à l'état sauvage dans une manade. Elle a présenté de l'amaurose et une hyperthermie à 39°C au premier examen, puis 7 jours après, une paralysie des postérieurs l'ayant conduit au décubitus. Elle a été euthanasiée et autopsiée immédiatement. Un isolement viral a pu être effectué seulement sur la partie terminale de la moelle épinière lombo-sacrée et a été identifié comme étant une souche du virus WN. Une reproduction expérimentale de la maladie de WN chez le cheval par trois voies d'inoculation (intraveineuse, sous-cutanée et intra-cérébrale) a été par la suite réussie à partir de cette souche (Joubert et al. 1971).

A l'époque, les auteurs concluaient déjà au fait que le syndrome « lourdiges » en Camargue traduisait l'existence de plusieurs affections, virales ou non, dont l'infection par le virus WN faisait partie et que le diagnostic étiologique ne pouvait être établi autrement que par la réalisation d'examen complémentaires. D'autre part, ce virus WN paraissait causer plus d'infections inapparentes que de maladies révélées dans cette zone d'étude. Ces mêmes

auteurs remarquaient également que l'infection à virus WN chez le cheval suivait des « cycles multi-annuels, probablement déterminés par les variations du climat, la biologie du vecteur et l'immunité spontanée occulte, engendrée par une atteinte antérieure, silencieuse ou exprimée » (Joubert et al. 1970b). Ils proposaient la participation de facteurs favorisant l'infection chez le cheval : le jeune âge, la dénutrition et le parasitisme.

Enfin le dernier volet de cette enquête de terrain en Camargue a porté sur la seule espèce de moustique identifiée comme naturellement infectée par le virus WN par 2 fois en France : *Culex modestus* Ficalbi (Hannoun et al. 1964, Mouchet et al. 1970). A l'époque, les auteurs n'excluaient pas la participation de *C. pipiens* pour maintenir et transmettre le virus parmi les Oiseaux. Mouchet et coll. en 1970 ont donc minutieusement étudié et décrit la répartition, l'historique, la biologie (écologie larvaire, cycle saisonnier, longévité des femelles, lieux de repos...), l'incidence épidémiologique et enfin l'isolement du virus WN chez *Culex modestus* en Camargue (Mouchet et al. 1970). Ils concluaient à la participation principale de ce moustique dans le cycle de transmission du virus WN, en particulier pendant les mois d'août et septembre en Camargue.

Après 1965, il n'existe plus de preuves de circulation du virus chez l'Homme ou le cheval dans la littérature. Une étude sérologique menée à petite échelle de 1975 à 1979 en Camargue a montré une séroprévalence de 4,9 % chez l'Homme (n= 235) et de 2 % (n =99) chez le cheval (Rollin et al. 1982). Des études en 1999 et 2000 ont démontré l'absence d'anticorps dirigés contre les Flavivirus chez les chevaux prélevés (Murgue et al. 2001b).

Il faut donc attendre 35 ans avant que le virus fasse reparler de lui en France. Le 6 septembre 2000, une épizootie équine a été déclarée en Camargue avec la confirmation par dosage d'IgM et d'IgG de deux infections par le virus WN sur des chevaux vivant à Lansargues dans l'Hérault (à 20 km à l'Est de Montpellier) et présentant des signes neurologiques aigus (Murgue et al. 2001b). Le 8 septembre, des biopsies de cerveau sur ces chevaux euthanasiés ont permis la détection d'ARN du virus WN dans le bulbe rachidien, le cortex, le cervelet et la moelle épinière lombaire. Les signes cliniques de ces deux chevaux ont débuté entre le 24 et le 28 août, ils présentaient une hyperthermie, une parésie des postérieurs, puis un décubitus. Un autre cheval avait présenté des signes cliniques comparables dans la même commune le 3 août et avait succombé quelques jours plus tard sans diagnostic établi.

La confirmation de ces infections par le virus WN a conduit à une alerte sanitaire par les Ministères de l'Agriculture et de la Santé, très inquiets de la situation en cette saison encore

touristique dans la région. Des mesures de démostication larvaire, ciblées sur *C. modestus*, ont été appliquées dès le lendemain de la confirmation des cas sur une surface de 200 ha environ, autour de Lansargues (Murgue et al. 2001b).

Les mouvements d'équidés ont été immédiatement interdits suite à des directives de l'Union Européenne, sur une zone de 25 km de rayon autour des écuries où des cas ont été confirmés dans les 30 jours précédents. Ces écuries ont été mises en quarantaine pendant 21 jours et à la fin de cette période, des dosages sérologiques ont été effectués. Cette mesure d'immobilisation a été très mal comprise par les propriétaires de chevaux qui ont dû annuler les nombreux événements équestres prévus à cette période. Plusieurs de ces personnes ont aujourd'hui avoué de ne pas avoir respecté ces mesures. Le principe de précaution a été appliqué alors qu'il existait plusieurs études expérimentales montrant une virémie très faible et de très courte durée chez les chevaux atteints (Schmidt et al. 1963, Joubert et al. 1971, Oudar et al. 1971). Les autorités sanitaires ont considéré à l'époque qu'il était difficile de statuer sur ces quelques études dont l'extrapolation était hasardeuse car valable dans des conditions et avec des souches différentes (Murgue et al. 2001b). Il faut souligner que pendant cette épizootie, les tentatives pour isoler du virus en RT-PCR à partir du sang des chevaux atteints, y compris ceux dont la biopsie de cerveau était positive, ont échoué.

Au 30 novembre 2000, 129 chevaux et 2 ânes avaient présenté des signes cliniques compatibles avec une maladie de WN. Cinquante-huit cas ont été confirmés (57 chevaux et un âne avec un dosage des IgM positif) et 18 cas étaient probables (dosages des IgG positif et des IgM négatif). La létalité était de 28 % (21 sur 76). Quarante-vingt pour cent des cas confirmés ont été déclarés avant le 30 septembre (Murgue et al. 2001b).

Une enquête sérologique à grande échelle a été menée sur tous les chevaux dans un rayon de 10 km autour des cas confirmés, pour tenter d'établir le nombre d'infections subcliniques. Sur les 5107 sérums prélevés de septembre à décembre 2000 (4776 chevaux et 91 ânes), 432 étaient positifs (prévalence = 8,5 % ; IC 95% = [7,7-9,2]), dont 182 également positifs en IgM (Durand et al. 2002). Malheureusement, pour des contraintes logistiques, seuls les sérums positifs en IgG ont été testés en IgM, les chevaux semi-sauvages n'ont pas été prélevés, la zone d'étude a été restreinte à seulement 10 km autour des cas et les prélèvements ont été collectés dès le début de l'épizootie et non pas en hiver. Tous ces facteurs ont très certainement conduit à une sous-estimation des infections sub-cliniques. Le plus grand

nombre de cas confirmés et de sérologies positives était concentré en zone sèche autour de Lunel, zone d'épizootie déjà décrite en 1962 (Durand et al. 2002).

Aucun cas humain n'a été confirmé en 2000. Seul 3 gardes-chasse ont eu des sérologies positives en IgG sans signes cliniques associés et l'un d'entre eux a présenté un dosage en IgM légèrement positif (Murgue et al. 2001b). Aucune mortalité aviaire anormale n'a été détectée mais des résultats sérologiques positifs ont été détectés sur 8 % des canards (*Anas platyrhynchos*), 0,9 % des goélands (*Larus cachinans*) et 22 % des pies (*Pica pica*) (Hars et al. 2001). Tous les « *pools* » de moustiques récoltés pendant l'épizootie étaient négatifs (Durand et al. 2002).

Cette période a beaucoup marqué les esprits des Camarguais qui ont gardé un souvenir très cuisant de l'épizootie, à cause de la mortalité des chevaux, des pertes économiques importantes (restrictions de mouvements des chevaux, annulation de nombreuses activités touristiques, comme par exemple des colonies de vacances ou des stages), de la peur et de l'incompréhension générale entretenues pendant cette période. Cet évènement a constitué sans aucun doute un handicap pour les enquêtes de terrain que nous avons effectuées ultérieurement, la confiance des propriétaires n'ayant pas été facile à reconquérir.

Une étude sérologique a été à nouveau conduite pendant l'hiver 2001-2002 dans un périmètre délimité par Beaucaire-Tarascon au Nord, Saint Martin de Crau et Port-Saint Louis à l'Est, la mer au Sud et Mauguio à l'Ouest. 488 sérums ont été récoltés dont 26 étaient positifs en IgG (5,3 %) et aucun positif en IgM (Leblond et al. 2005). La surveillance sérologique d'oiseaux sentinelles (une séroconversion sur un canard, une sur une poule) avait montré une circulation virale sans cas cliniques déclarés (Hars et al. 2005).

En 2003, le virus WN fait à nouveau parler de lui en France, dans le Var cette fois. L'originalité de cet épisode était que des cas humains ont été rapportés et que leur détection précédait celle des cas équins (Mailles et al. 2003, Durand et al. 2005). Les premiers cas humains ont été confirmés par sérologie le 6 octobre : il s'agissait d'un homme vivant à Fréjus et atteint d'encéphalomyélite, dont le début des signes datait de fin août. Sa femme avait présenté une fièvre d'origine indéterminée quelques jours auparavant. Grâce à une étude rétrospective des cas humains hospitalisés pour des signes cliniques compatibles avec une maladie de WN, cinq autres cas ont été confirmés (Del Giudice et al. 2004). Ces 7 patients ont guéri.

Le 9 octobre 2003, le premier cas équin a été confirmé par analyse sérologique IgG et IgM. Ce cheval avait présenté des signes d'encéphalite mi-septembre, puis avait récupéré (Durand et al. 2005). Après une étude rétrospective des cas équins similaires dans les mois précédents, deux autres cas confirmés par sérologie ont été identifiés, ainsi qu'un cas probable. Aucune mortalité aviaire anormale n'a été détectée et le petit nombre de « *pools* » de moustiques récolté était négatif. Comme en 2000, une étude sérologique autour du premier cas équin confirmé a été effectuée mais cette fois-ci dans un rayon de 30 km. Neuf-cent-six sérums ont été collectés et 305 d'entre eux étaient positifs en IgG (34 %), parmi lesquels 23 étaient également positifs en IgM (7,5 %) (Durand et al. 2005).

En parallèle en 2003 en Camargue, la surveillance sérologique d'oiseaux sentinelles n'a pas montré de séroconversions et aucun cas clinique humain ou équin n'a été rapporté (Hars et al. 2005).

En 2004, une nouvelle épizootie s'est déclarée en Camargue fin août, essentiellement dans la région des Saintes Maries de la Mer : 32 cas équins ont été confirmés par le laboratoire dont 7 morts et 5 classés comme probables (Zeller et al. 2004a, Leblond et al. 2007b). Encore une fois, aucune mortalité aviaire inhabituelle n'a été rapportée et aucun « *pool* » de moustiques ne s'est révélé positif (Leblond et al. 2007a). Par contre une séroconversion a été détectée dès le mois de juillet sur un poulet sentinelle près des Saintes Maries de la Mer. Puis 12 autres oiseaux sentinelles (canards et poulets) ont séroconverti dans la même commune, mais également à Saint Just, Saint Laurent d'Aigouze et à la Tour du Valat près du Sambuc d'août à octobre (Hars et al. 2005) (Carte 1). Des anticorps IgG dirigés contre le virus ont été détectés sur trois pies juvéniles et un moineau (*Passer domesticus*) sains, capturés pendant l'épizootie. Le virus a été isolé et séquencé sur les cerveaux d'une pie et d'un moineau malades et morts peu après leur capture (Jourdain et al. 2007b).

En 2005, 271 pies ont été capturées pour une surveillance sérologique dans des sites où des cas équins avaient été confirmés en 2004 (Jourdain et al. 2008). Une prévalence de 10,7 % (IC 95 % = [7,3-15]) a été observée, sans aucune séroconversion. De plus, les oiseaux adultes avaient une prévalence significativement plus élevée que les juvéniles, indiquant une exposition ancienne au virus. Enfin la détection d'ARN viral par PCR nichée sur un écouvillon cloacal de pie juvénile séropositive suggérait tout de même une circulation virale cette année-là, même si aucun autre signe de transmission n'a été détecté par les réseaux de surveillance aviaire et équine en 2005 (Jourdain et al. 2008).

Fin septembre 2006, 5 cas cliniques équités d'infection à virus WN ont été confirmés dans les Pyrénées Orientales, autour d'Argelès-sur-Mer (Eloit 2006).

Enfin une étude sérologique sur les oiseaux sauvages de 2005 à 2007 en Camargue portant sur 3978 sérums issus de 3250 oiseaux capturés a montré une séroprévalence globale très faible de 0,3 % (Balanca et al. 2009). Les espèces ayant des anticorps dirigés contre le virus WN étaient des moineaux (*Passer domesticus*) (0,46 % ; n = 7/1526), des pies (*Pica pica*) (0,8 % ; n=2/256) et des hiboux juvéniles (*Otus scops*) (0,33 % ; n=2/6). La recapture de 239 oiseaux a montré une séroconversion sur un moineau survenue entre mars et octobre 2007. Cette séroconversion, ainsi que la détection d'oiseaux séropositifs pendant les 3 années de l'étude, en particulier sur deux oiseaux juvéniles, a conduit les auteurs à suggérer une circulation annuelle faible mais constante du virus WN dans la région.

En conclusion, le virus WN a suivi une évolution typique de beaucoup d'arbovirus dans la région de Camargue, caractérisée par de longues périodes de circulations à bas bruit, entrecoupées d'émergences. Reste à déterminer par quels mécanismes le virus peut circuler chaque année en France (réintroduction ou maintien pendant l'hiver), quels facteurs conduisent à son amplification, puis à son émergence et enfin si cette évolution se poursuivra à l'identique dans l'avenir ou si des émergences plus graves et/ou plus fréquentes sont à prévoir.

2. Description de la zone d'étude principale : La Camargue

L'origine exacte du mot Camargue est inconnue. Plusieurs hypothèses sont proposées, dont celles en langue d'Oc : *cara-marca* qui veut dire « chère frontière » ou *n'a cap marca* qui signifie « n'a pas de frontière » (Balaÿ et al. 2007). Les deux significations pourraient très bien convenir à cette région si particulière de France, qui donne l'impression d'un espace sans limites, mais qui pourtant comprend des limites bien marquées entre les milieux.

Géographie de la Camargue

La Camargue au sens strict désigne l'île enserrée entre les deux bras du Rhône qui se divise au Nord d'Arles, en un Petit Rhône à l'Ouest et un Grand Rhône à l'Est (Carte 2).

La Grande Camargue est située entre les deux bras et en son cœur se trouve l'Étang du Vaccarès. La presque totalité de cette zone est classée depuis 1970 en Parc Naturel Régional (86 000 ha, 7200 habitants permanents en 2007) (Balaÿ et al. 2007). Le Parc abrite lui-même la Réserve Nationale de Camargue (13 000 ha) fondée en 1927, classée Réserve Naturelle en 1975 et centrée sur l'étang du Vaccarès (Balaÿ et al. 2007).

La Petite Camargue est située à l'Ouest, entre l'ancien Rhône vif et le Petit Rhône, la Camargue Gardoise entre le Petit Rhône et le Canal du Rhône à Sète et enfin le Grand Plan du Bourg à l'Est du Grand Rhône (Carte 2). Cette région est le lieu de mélange entre les eaux douces du Rhône et les eaux salées de la Méditerranée. L'eau structure le paysage depuis des siècles dans cette région. De fortes interventions de l'Homme comme l'endiguement total au 19^{ème} siècle ont permis de stabiliser des phénomènes comme les crues du Rhône, les inondations et la salinisation des sols, par une gestion presque complètement artificielle de l'eau, dans l'espace et dans le temps. Cette région, soumise au climat méditerranéen caractérisé par un déficit important en eau en été, vit chaque année le phénomène inverse grâce au drainage et à l'irrigation, permettant la mise en eau des rizières au printemps et en été. Les marais salants offrent également des surfaces en eau salée, riches en ressources alimentaires pour certains oiseaux l'été.

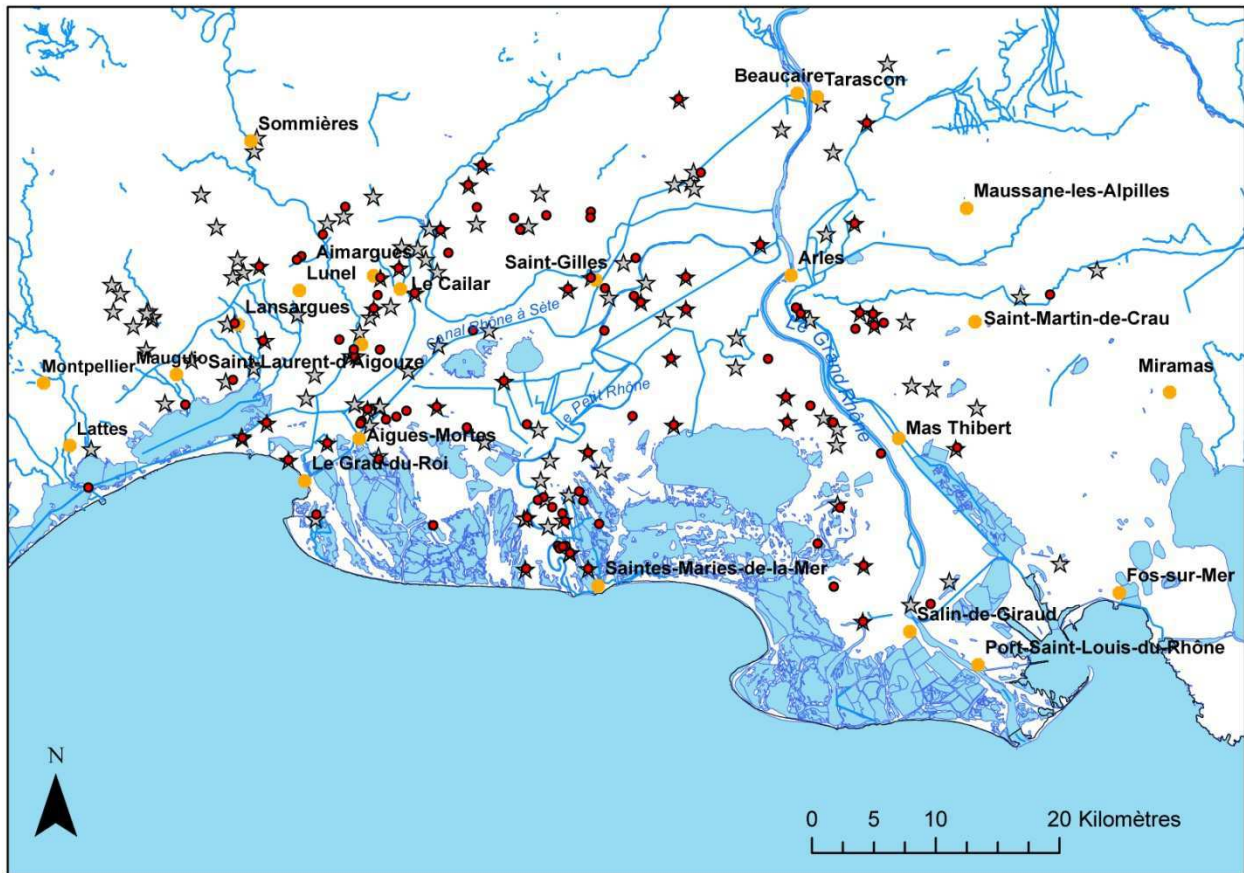
Carte 2: Géographie de la Camargue



Il convient de préciser que la zone d'étude qui est appelée « Camargue » dans ce manuscrit comprend un territoire plus large que le seul delta du Rhône. En effet il est logique d'employer souvent ce terme au sens large car les bras du Rhône n'ont pas toujours suivi le cours actuel et la zone plus vaste englobée dans ce terme présente un environnement très similaire de celui du Delta.

En fait la zone d'étude est délimitée par : à l'Est Maussane et Fos sur Mer, au Sud la mer Méditerranée, à l'Ouest Lattes et Montpellier, au Nord Sommières, Nîmes et Beaucaire-Tarascon (Carte 3).

Carte 3: Répartition des écuries visitées en 2004, 2007 et 2008



- Ecuries visitées en 2004
- ☆ Ecuries visitées en 2007 et 2008

Cette région est unique en France mais ses caractéristiques géographiques, climatiques, géologiques et biologiques sont proches d'autres zones de deltas méditerranéens comme en Espagne, au Portugal et en Italie. Ces caractéristiques uniques en France ont de fortes répercussions sur le peuplement des milieux par une faune et une flore particulières, qui interviennent nécessairement dans le cycle de transmission du virus WN.

La Camargue est une plaine d'alluvions quaternaires déposées par le Rhône et dont l'altitude est partout inférieure à 10 m (Hoffmann et al. 1968). Au Nord-Ouest, cette plaine s'adosse aux collines calcaires du Gard. Au Sud-ouest, s'étend la petite Camargue, plaine du Bas-Languedoc. Au Nord-est, la plaine s'adosse aux coteaux calcaires de Provence et au Sud d'Arles, s'étend la plaine de la Crau (Carte 2).

Les sols du Nord de la Camargue ne sont pas atteints par le sel, alors que ceux du Sud, souvent inondés, sont halomorphes. Du fait de la texture limoneuse ou limono-sableuse des sols et du faible dénivelé, les zones d'eaux stagnantes sont nombreuses : vastes étangs salés au Sud contre marais d'eau douce au Nord. Le système hydrographique de la Camargue est essentiellement constitué des bras du Rhône actuellement endigués (Grand Rhône et Petit Rhône), desservant un réseau artificiel complexe de roubines et de canaux alimentés par des stations de pompage. Au Sud-est, les étangs sont reliés à la mer par des chenaux artificiels et sont transformés en salins. Le Vaccarès et les étangs du centre du delta reçoivent des apports d'eau douce du Rhône, trop plein de l'irrigation des cultures. Ils ont tendance à s'adoucir du fait de l'irrigation des rizières. Enfin lors de pluies abondantes, de très nombreuses mares temporaires se créent sur les sols imperméables, leur salinité dépendant de la teneur du sol en NaCl (Hoffmann et al. 1968).

La présence variable de sel dans le sol est fondamentale pour expliquer la formation de biotopes spécifiques de la Camargue, comme les sansouires, déterminant la répartition des espèces animales comme les moustiques.

La Camargue est une des régions les plus sèches de France (précipitations annuelles comprises entre 400 à 800 mm du Nord au Sud) (Balenghien 2006). Les pluies sont de plus en plus abondantes au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la mer. D'autre part, cette région de plaine offrant peu d'obstacles naturels est soumise à une fréquence et une violence des vents caractéristiques, comme le Mistral. En été, du fait des hautes températures, de l'ensoleillement et du Mistral, une intense évaporation assèche les marais temporaires et est

mise à profit dans les salins. L'automne est la saison la plus pluvieuse, alors que l'hiver et le printemps sont presque comparables.

Paysages de la Camargue

Les zones écologiques successives de la Camargue ont été très précisément décrites par Hoffmann et coll. en 1968 (Hoffmann et al. 1968).

En partant de la mer, s'étend tout d'abord une plage de sable fin, large de quelques mètres à plusieurs hectomètres, bordée par un cordon de dunes côtières. Ce milieu abrite de nombreux mollusques et crustacés, excellente nourriture pour les oiseaux sauvages.

Plus au Nord, la sansouire basse couvre les zones d'étangs saumâtres, voire sursalés (marais salants), formant une zone de transition grâce à l'apport important d'eau douce et dont la végétation unique dans les zones émergées est la salicorne (*Arthrocnemum glaucum*). Cette sansouire héberge entre autres des Tabanidés et Culicidés, comme *Aedes caspius* et *A. detritus*.

La sansouire haute et les marais couvrent une zone beaucoup plus étendue, du nord de la précédente jusqu'à Arles (Figure 2). En hiver, ces zones sont immergées par les eaux de pluie. Une autre salicorne croît dans ce milieu (*Salicornia fructicosa*). Sur les terrains plus secs et moins salés, cette végétation est remplacée par la pelouse à saladelle (*Statice limonium*, *Obione portulacoides*...), parsemée de tamaris (*Tamarix gallica*), d'ormeaux (*Ulmus campestris*) et de nombreuses xérophytes. Des peupliers (*Populus alba*) et des ronces (*Rubus sp.*) peuvent border les roubines qui traversent ce milieu, si elles sont irriguées de façon permanente et abondante, alors que les roseaux (*Phragmites communis*, *Typha angustifolia*) envahissent les roubines elles-mêmes. La végétation des marais de la sansouire haute est composée également de roseaux, mais également de scirpes (*Scirpus*), joncs, *Myriophyllum spicatum* et *Potamogeton pectinatus*. Ce milieu est plus riche et plus diversifié en espèces animales aquatiques et terricoles. En ce qui concerne les moustiques, les larves d'*Aedes caspius* et d'*A. detritus* sont retrouvées dans les eaux saumâtres aussi bien que douces, contrairement à *Culex modestus*, *C. pipiens* et les Anophèles qui sont exclusivement dulçaquicoles.

Figure 3: Photographie d'un paysage de sansouire haute (Source : Dr Elsa Moulin)



Pour résumer, les sansouires ou enganes dominent les zones où la salinité est importante, les roselières occupent des milieux à inondation longue et salinité faible et enfin les prés salés où peuvent paître chevaux et taureaux se trouvent dans des milieux où l'inondation est périodique ou accidentelle.

La Crau est composée de milieux très variés, c'est une plaine caillouteuse, cône de déjection marquant l'ancien lit de la Durance, à végétation steppique. La végétation est composée de scirpaies, de roselières à Phragmites, de peuplements de chênes verts, de garrigue et parfois de marais.

La ripisylve s'étend le long des bras du Rhône et dans ses îles. Dans cette forêt-galerie, le peuplier blanc, l'aulne, le saule blanc, le frêne et dans les portions les plus hautes le chêne sont retrouvés. Cette bande arbustive a eu tendance à s'amincir au profit de vergers irrigués.

Au nord de la zone d'étude, la majeure partie des milieux est constituée par des cultures qui se développent vers le sud et le centre au détriment de la sansouire haute. Les rizières sont les principales cultures dans cette zone (20 000 ha en 2006 (Balenghien 2006)), se comportant comme un marais ouvert, puis comme une roselière au fur et à mesure de la croissance du riz. Elles contribuent fortement au dessalage des sols par l'apport continu d'eau douce. Les autres cultures sont les céréales qui alternent souvent avec les rizières, la vigne, les vergers, les luzernières et les prairies artificielles irriguées. Ces cultures sont abritées du Mistral par des haies de cyprès.

Les milieux urbains ne doivent pas être négligés car ils hébergent de nombreux gîtes larvaires de *C. pipiens* dans les caves inondées, citernes, bassins et fosses septiques.

La zone des étangs du sud de Montpellier ne diffère pas de la partie littorale de la Camargue, excepté la forte urbanisation de la côte, de Carnon à Port-Camargue.

Enfin la Costière correspond à un ancien bras du Rhône, formée par le dépôt de matériaux grossiers, comme les galets. Cette vaste plaine est dominée par Nîmes dans le Gard et s'étire vers Montpellier en s'amincissant, entre les garrigues au Nord et les étangs au Sud (Balenghien 2006). Cette zone est traversée par de nombreux cours d'eau : le Vidourle, le Dardaillon... et drainée par le Vistre. La vigne est prédominante dans cette région, associée à des cultures maraîchères, céréalières et à de grands vergers. Cette zone contraste fortement avec la Camargue, par l'absence d'étendues d'eau et l'urbanisation.

A l'opposé de ce que peuvent laisser penser les vastes étendues peu peuplées de Camargue aux nouveaux visiteurs, les paysages actuels ne résultent pas d'une nature laissée à l'état sauvage et à l'abandon par l'Homme, mais sont au contraire le fruit de travaux humains colossaux et constants : l'irrigation, le drainage et l'endiguement (Tomas-Roux 1998). Pour maintenir un équilibre sans cesse remis en cause par les « caprices » du Rhône, l'entrée de la mer, le sel et le vent, l'homme a transformé la Camargue en un vaste réseau hydrographique, les canaux et roubines, alimentés par des pompes et des vannes. Mais cette gestion sans cesse renouvelée de l'eau et du sel met en conflit permanent des utilisateurs aux besoins différents, du riziculteur au chasseur, en passant par la compagnie salinière, le touriste et l'écologiste...

Pour une description détaillée du littoral et du climat méditerranéens français, ainsi que de l'environnement camarguais, dans l'optique d'une étude épidémiologique sur les vecteurs du virus WN, le lecteur peut se référer à Balenghien (Balenghien 2006). Les milieux temporaires humides de Camargue, comme les sansouires, milieu très propice pour les

moustiques *Culex modestus* et *C. pipiens* sont très minutieusement décrits. Pour chaque milieu, les connaissances sur les moustiques présents sont détaillées.

Oiseaux de Camargue

La population aviaire de Camargue comptait en 1968, 323 espèces différentes avec une prédominance pour les espèces adaptées aux zones humides (Hoffmann et al. 1968) et en 2009 plus de 400 espèces sont répertoriées (Brochure grand public « La Camargue, un trésor de biodiversité : états des lieux et enjeux pour l'avenir » publiée le 12 février 2009 par la Tour du Valat et téléchargeable à l'adresse : www.tourduvalat.org/actualites/projets , consultée le 24 septembre 2010).

Toutes les espèces dénombrées peuvent être classées en oiseaux sédentaires (ex : moineaux), nicheurs en Camargue émigrant en Afrique tropicale (ex : hirondelles), nicheurs au Nord et à l'Est de l'Europe, hivernant en Afrique tropicale et ne séjournant en Camargue qu'au passage (ex : fauvettes), nicheurs au Nord et à l'Est, hivernant en Camargue et ailleurs autour de la Méditerranée (ex : étourneaux).

Les routes de migration passant par la Camargue sont dirigées généralement du Nord-est au Sud-ouest à l'automne et en sens inverse au printemps.

Les groupes d'oiseaux les plus importants en Camargue sont :

-les anatidés (canards et oies) : ces oiseaux nichent dans le Nord-est de l'Europe, hivernent en Camargue, voire en Afrique occidentale (Mali, Sénégal).

- les laridés (mouettes, goélands...) : leurs effectifs se sont multipliés dans les ports et décharges, ils sont maintenant en grande partie sédentaires, mais aussi migrateurs d'Europe centrale et septentrionale en hiver. Parfois ils migrent de façon erratique vers l'Ouest.

- les limicoles (chevaliers, pluviers...) : ce sont de très grands migrateurs qui passent en Camargue à l'automne et au printemps. Ils sont originaires de Scandinavie, Russie et Sibérie et vont passer l'hiver en Afrique occidentale et équatoriale, mais ils peuvent hiverner parfois en Camargue.

- les ardéidés (hérons) : ils abondent et nichent en Camargue en colonies, une partie hiverne en Afrique occidentale et équatoriale, l'autre hiverne en Camargue. A la fin de l'été et à l'automne, les hérons cendrés, originaires d'Europe centrale, stationnent en Camargue.

- les rallidés (foulques, poules d'eau...) : les espèces herbivores vivent dans les marais ouverts, les insectivores dans les roselières. Migrateurs venant d'Europe centrale, ils nichent et hivernent en Camargue (foulques), une partie des nicheurs émigrent vers l'Afrique.

- les phoenicotéridés (flamands roses) : ils vivent sur les étangs saumâtres, leur population maximale est atteinte en été. Certains restent l'hiver, d'autres émigrent jusqu'au Sénégal.

Quelques rapaces et passereaux sont liés aux milieux humides, tel que le busard des roseaux (*Circus seriginosus*), rousseroles et mésanges. Ils peuvent être migrateurs ou sédentaires.

Des études détaillées sur les Oiseaux de Camargue et le virus WN ont été menées récemment (Jourdain et al. 2007a, Jourdain et al. 2007c).

L'évolution des activités humaines en Camargue a profité aux espèces d'oiseaux d'eau douce et en moyenne tous les dix ans, trois à quatre nouvelles espèces nichent en Camargue. D'autres espèces ont disparu en parallèle mais il est observé une augmentation d'un indice quantifiant la biodiversité de 65 % de 1970 à 2007 en Camargue (Brochure grand public « La Camargue, un trésor de biodiversité : états des lieux et enjeux pour l'avenir »). Certaines espèces ont profité des mesures de protection mises en place en France ou à l'étranger au 20^{ème} siècle. Pour d'autres, la raison de l'augmentation de leurs effectifs est inconnue. La cause pourrait être des changements non identifiés dans d'autres zones fréquentées par ces espèces.

Mammifères de Camargue

Les mammifères hors espèces d'élevage présents en Camargue sont généralement présents ailleurs en France. Les espèces prépondérantes sont le castor, le ragondin, le sanglier, le renard, le lapin, la belette, le blaireau et le lièvre.

Deux espèces principales sont élevées en Camargue, mais de façon très atypique en France : le taureau et le cheval (faisant l'objet du paragraphe suivant). Cet élevage est extensif, les animaux ont à disposition un espace très important (2,5 ha/tête), ils vivent uniquement à l'extérieur, y compris pendant l'hiver et l'homme intervient très peu, que ce soit pour l'alimentation, la reproduction ou les mesures sanitaires (vaccination et vermifugation).

Le taureau de Camargue est un animal considéré comme noble et traité ainsi par les manadiers et gardians qui s'en occupent. Il est élevé en liberté totale sur de grands espaces de plusieurs centaines d'hectares. Cette race a été sélectionnée pour sa grande rusticité, plus ou

moins naturellement, du fait des conditions climatiques rudes et de la pauvreté des ressources alimentaires en hiver dans les pâturages salés (Hoffmann et al. 1968). Le taureau de race Camargue, fin, souple et nerveux, est élevé avec patience depuis plusieurs dizaines d'années en vue d'être utilisé pour les courses à la cocarde ou libres, sport typique de la Camargue (Cardinale 1994). La sélection des taureaux se fait aussi sur des critères de conformation bouchère, du fait de la reconnaissance en AOC de la viande de taureau Camargue depuis 2000. Plusieurs élevages de taureaux de combat, utilisés pour les corridas ou les novilladas sont également présents. Ces taureaux sont issus du croisement de taureaux camarguais avec des taureaux espagnols ou de taureaux de pure race espagnole.

Il existe également un élevage ovin non négligeable dans la zone d'étude qui est essentiellement concentré en Crau. Ces troupeaux transhument de juin à octobre vers les Alpes. Enfin quelques élevages porcins sont rarement rencontrés, comptant quelques dizaines d'animaux.

La population humaine en Camargue

Les régions littorales de sansouire basse sont pour la plupart quasi-désertiques et l'homme n'y pénètre que très rarement à des fins professionnelles avec autorisation, puisque ce sont des propriétés privées détenues par les sociétés salinières ou le Parc Naturel Régional de Camargue. Les zones de sansouire haute abritent de grands mas d'élevage de taureaux et/ou chevaux de race Camargue (de 100 à plus de 1000 ha). La densité de population humaine est très faible dans ces zones de « pâturages ». La chasse est beaucoup pratiquée en dehors de la Réserve naturelle. Plus au Nord, se trouvent des zones agricoles de rizières, céréales et vignes, dans lesquelles la population humaine est concentrée dans de gros villages et villes.

La population totale recensée en 2007 dans les trois départements concernés par nos études, le Gard, l'Hérault et les Bouches-du-Rhône est de 3 659 980 personnes (Données INSEE Recensement 2007, consultables à l'adresse : www.insee.fr/fr).

Des contacts étroits de la population humaine avec la Nature ont lieu pour différentes activités en Camargue :

-travail saisonnier dans les cultures : riz (repiquage), vigne (vendanges...), vergers (traitement, récolte...),

-travail dans les pâtures des manadiers et gardians à cheval pour l'élevage de taureaux et chevaux,

-chasse par les locaux et les touristes,

-activités traditionnelles de Camargue directement dans les pâtures : ferrade, déjeuner au pré, « abrivado »...

-tourisme dans toute la région pour l'observation des oiseaux, les balades à pied, à cheval, en jeep, les activités nautiques ou autres sur les plages...

Une exposition très importante aux piqûres de moustiques d'une population non locale a lieu dans la région et cette population est souvent non immunisée contre les pathogènes enzootiques, pendant la saison à risque.

Il convient maintenant de détailler l'importance et le mode de vie de notre animal d'étude, indicateur de la circulation du virus WN : le cheval en Camargue.

3. Le cheval en région Camargue

a) La filière équine en région Camargue

Les activités équestres pratiquées dans les trois départements du Gard, de l'Hérault et des Bouches-du-Rhône sont très diverses. Les différentes structures rencontrées sont multiples.

Les écoles d'équitation pratiquent souvent plusieurs activités : dressage, concours de saut d'obstacles (CSO), concours complet d'équitation (CCE), promenade, « *pony games* », horse-ball...et comprennent un effectif de chevaux et poneys.

Les centres de tourisme équestre pratiquent les promenades, les randonnées, l'équitation traditionnelle camarguaise avec des chevaux et parfois quelques poneys.

Les écuries dites « de propriétaires », permettent aux particuliers de mettre en pension leurs chevaux dans des structures spécialisées.

Un grand nombre de particuliers détient de petits effectifs de chevaux, souvent 2, pour du loisir essentiellement. Cette catégorie est extrêmement difficile à quantifier, mais est minoritaire par rapport aux deux précédentes (Terry 2007).

L'activité des courses est également minoritaire : un seul hippodrome se trouve en bordure de la zone d'étude à Nîmes et la plupart des chevaux de course sont élevés et entraînés hors de cette zone.

Il faut souligner qu'une même structure peut souvent cumuler plusieurs activités, y compris l'élevage, complexifiant encore la description de ces établissements équestres.

Terry en 2007 a estimé, d'après des études sur la filière équine en Languedoc-Roussillon en 2003 et en région Provence Alpes Côte d'Azur (PACA) en 2007, que l'élevage de chevaux dans le Gard, l'Hérault et les Bouches-du-Rhône est dominé par les chevaux de selle. Dans le Gard et l'Hérault, la première race élevée en nombre de juments était la race Camargue, suivie par les Lusitaniens et les Pur-Sangs Arabes. Les élevages les plus importants en nombre de chevaux étaient aussi de race Camargue, suivis des Lusitaniens, Arabes, Barbes, Pure Race Espagnole, Merens et Selle Français. En PACA, la race Camargue est la 3^{ème} race élevée en nombre d'élevages, derrière l'Arabe et le Selle Français.

Terry a également mené une étude descriptive des différents types de structures équestres de la région Camargue : type d'activité, nombre total de chevaux détenus, âge moyen des chevaux, estimation du taux de renouvellement...Plusieurs sources de données ont été utilisées (Terry 2007) :

- une base de données d'écuries, créée par le Pr Agnès Leblond en 2001 pour étudier la maladie de WN chez le cheval dans cette région (Leblond et al. 2005),
- une liste d'éleveurs de chevaux établie grâce à la DSV (Direction des services vétérinaires) du Gard,
- une enquête de terrain (entretiens physiques et téléphoniques) pour mettre à jour les données déjà collectées et en collecter de nouvelles.

Les résultats de cette étude montrent que les élevages de chevaux Camargue détiennent le plus grand nombre de chevaux par écurie (moyenne = 26), suivis par les centres équestres (moyenne = 18). Les centres équestres détiennent les chevaux avec la moyenne d'âge la plus élevée (14,5 ans). Le taux général de mortalité est d'environ 2 % par an pour toutes les catégories de structures, sauf les centres équestres (1 % environ). Enfin, le taux de renouvellement de la population équine dans cette région est de 14 % par an, toutes catégories confondues, avec logiquement un taux de renouvellement beaucoup plus faible

pour les élevages. En 5 ans, plus de la moitié de la population équine des centres équestres change, d'après cette étude.

La filière équine en région Camargue offre une grande variété de structures équestres ayant chacune des caractéristiques propres et pouvant être rencontrées ailleurs en France. Par contre les manades et l'élevage du cheval Camargue constituent un élément très original dans la filière équine. L'essentiel des activités équestres de la région est tourné vers l'élevage du cheval de pure race Camargue, sélectionné pour sa rusticité et ses grandes qualités indispensables aux gardians et manadiers pour l'élevage du taureau camarguais.

b) Les manades et le cheval Camargue

Le terme de manade peut être employé aussi bien pour un troupeau de taureaux camarguais élevé en pleine nature que l'équivalent pour les chevaux. Il désigne d'ailleurs à la fois le troupeau et le lieu d'élevage. A l'origine, la manade de chevaux Camargue et en particulier la manade de juments ou « rosso » en provençal servait à fouler les céréales en terre d'Arles. Ce mode de travail très éprouvant pour les chevaux a été abandonné peu à peu vers 1880, à la suite de l'apparition des batteuses mécaniques beaucoup plus efficaces et rentables (Cardinale 1994). Aujourd'hui, les grandes manades de chevaux ont presque toutes disparu, mais le cheval Camargue est toujours utilisé avant tout comme l'outil de travail du gardian pour rassembler, déplacer et trier les taureaux (Cardinale 1994). Des activités traditionnelles comme les ferrades consistant à marquer les veaux de l'année, permettent de montrer les qualités exceptionnelles de certaines montures qui excellent dans le tri.

La race Camargue

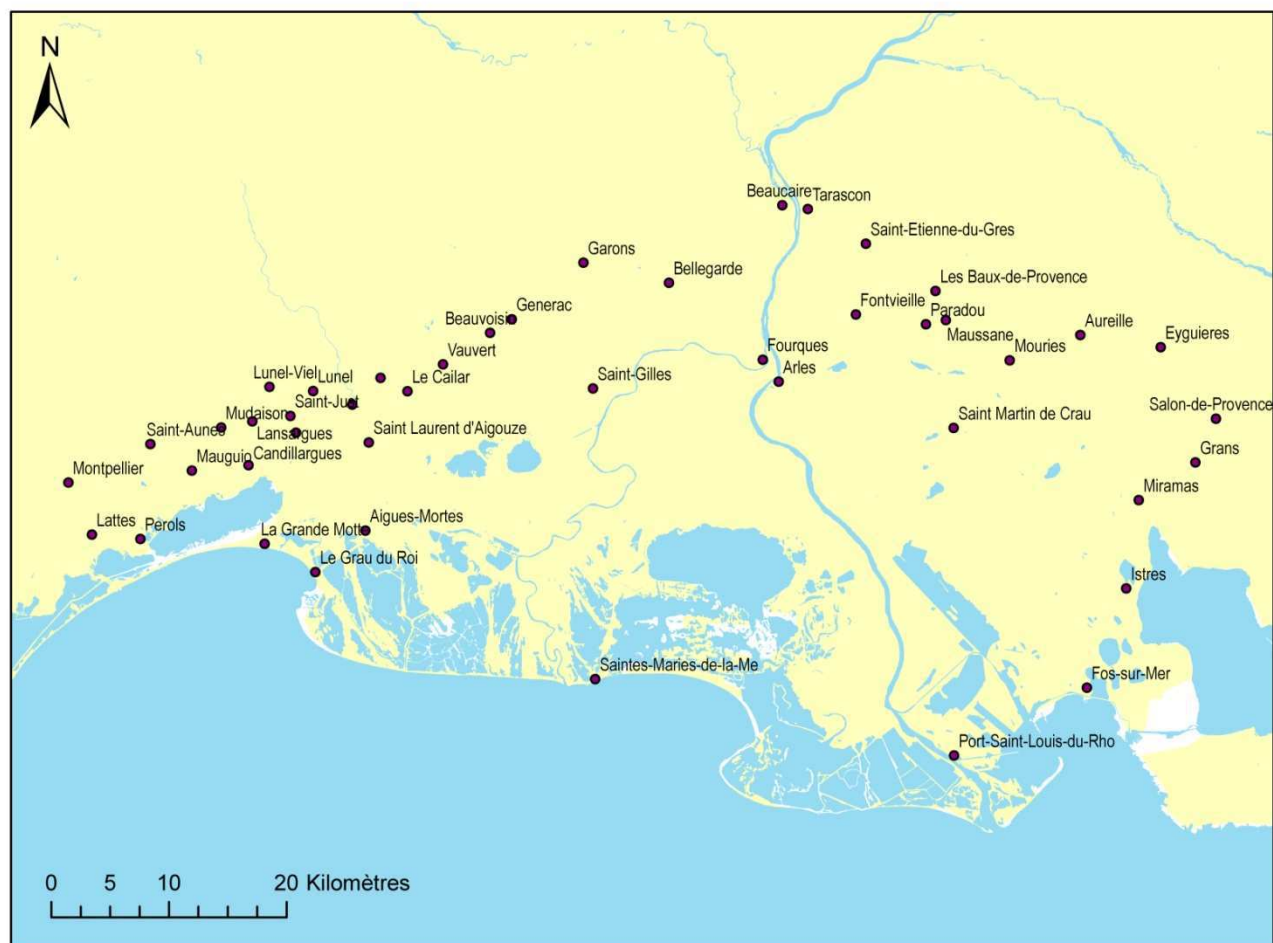
L'origine du cheval Camargue, qui remonterait au minimum à l'époque romaine aux environs de 350 après Jésus-Christ, est encore l'objet de nombreuses théories qui sont successivement exposées par Tomas-Roux (Tomas-Roux 1998).

La race Camargue a subi de nombreux croisements au cours de son histoire avec de nombreuses races pour tenter d'améliorer certains critères comme la rapidité et la taille. Le Pur-Sang Anglais, le Barbe, l'Espagnol, le Percheron, le Trait Breton ont été utilisés à ces fins, en particulier à la fin du 19^{ème} siècle. Les croisements les plus réussis se sont faits avec l'Arabe. Depuis 1978, les croisements sont interdits, mais officieusement ils existent encore.

Certains chevaux Camargue trahissent parfois leurs origines non réglementaires et il est important de garder à l'esprit que cette race n'est pas parfaitement pure et de se rappeler de ce passé. Il paraît surprenant que cette race ait gardé son type originel si intact malgré ces nombreux croisements, certains auteurs l'expliquent par la capacité des races rustiques à absorber les croisements et éliminer rapidement les influences d'autres races (Tomas-Roux 1998).

En 1964, est créée l'Association des Eleveurs de Chevaux de Race Camargue (A.E.C.R.C) de la volonté de quelques éleveurs de sauvegarder cette race très ancienne et préserver l'élevage camarguais traditionnel (<http://www.aecrc.com/aecrc/index.php>). Leur première tâche fut de définir les caractéristiques de la race (qui aboutira au standard de la race) et de délimiter l'aire géographique propre à l'élevage du Camargue, aire qui deviendra le « berceau de la race », incluant le delta du Rhône et ses régions périphériques. Trois régions sont actuellement concernées (Provence = 16 communes, Camargue = 2 communes et Languedoc = 27 communes) et une liste de communes est légalement définie à l'annexe II du règlement du Stud-Book du cheval Camargue, récemment paru au JO du 25 mars 2010 (disponible en ligne à l'adresse : <http://www.aecrc.com/aecrc/stud-book-cheval-camargue.php>, consulté le 26 juillet 2010) (Carte 4).

Carte 4: Le berceau de la race Camargue



- Les 45 communes délimitant le berceau de la race Camargue

En 1967, l'Association entreprend le recensement détaillé des chevaux dits « Camargue » dans les élevages existants. Le terme de « manade » est alors légalement défini : « un élevage extensif en liberté et plein air intégral, de chevaux Camargue comprenant au minimum quatre juments reproductrices, stationnées toute l'année dans le berceau de race, sur un territoire comportant deux hectares par UGB (Unité Gros Bétail), avec un minimum de vingt hectares d'un seul tenant, en propriété ou en location ». A toute manade correspond un nom et une marque à feu qui sont enregistrés par l'association de race agréée, lorsque la manade est reconnue. La liste des manades reconnues et de leurs marques au feu est tenue à jour et publiée annuellement par les Haras Nationaux sur proposition de la commission du Stud-Book. Le règlement complet du Stud-Book du cheval Camargue est paru au JO du 25 mars 2010 et est disponible en ligne à l'adresse : <http://www.aecrc.com/aecrc/stud-book-cheval-camargue.php>, consulté le 26 juillet 2010.

Dès lors, seuls les chevaux « nés, élevés et se reproduisant en manades » eurent le droit d'appartenir à la race « Camargue ». Ainsi la date de création et la date d'ancienneté de la manade peuvent être différentes pour les plus anciennes, puisque la date d'ancienneté correspond à celle de la reconnaissance officielle du 1er étalon marqué du fer de l'élevage. Cette date de reconnaissance officielle n'est jamais antérieure à 1978, date de reconnaissance de la race du cheval Camargue.

La collaboration entre l'A.E.C.R.C. et le Parc naturel régional de Camargue depuis 1974 et l'action conjointe de l'Administration des Haras nationaux aboutirent à la promulgation de l'arrêté ministériel du 17 mars 1978 portant reconnaissance officielle de la race du cheval Camargue, classée aujourd'hui dans la catégorie des chevaux de sang. Par arrêté ministériel du 10 octobre 2002, le Stud-Book du cheval Camargue est inclus dans le livre généalogique des races françaises de chevaux de selle.

Par le biais de la Commission Nationale d'Approbation, l'Association procède chaque année à une sélection des reproducteurs, en partenariat avec les Haras nationaux. Par ailleurs, ceux-ci assurent les relevés du signalement des poulains, enregistrant leur inscription dans le livre généalogique de la race Camargue.

L'arrêté ministériel du 23 avril 2003 a officialisé le rôle antérieurement joué par l'A.E.C.R.C. et étendu ses missions en l'agréant pour intervenir dans la sélection et l'amélioration génétique des équidés. En 2003, l'Association s'est également ouverte à tous les éleveurs français, quels que soient le lieu d'implantation de l'élevage et le nombre de juments

reproductrices. Si bien que l'Association, au nombre d'adhérents sans cesse croissant, compte aujourd'hui 261 membres répartis dans trois collèges distincts, selon qu'il s'agit d'élevages en manade (99 élevages), hors manade (60 élevages) ou hors berceau (102 élevages) et de manades outre-mer ou à l'étranger (2 élevages) (<http://www.aecrc.com/aecrc/stud-book-cheval-camargue.php>, consulté le 26 juillet 2010).

L'élevage du cheval Camargue

La manade est scindée toute l'année en plusieurs troupes :

- les poulinières suitées (accompagnées de leurs poulains de quelques mois) et un étalon, (il existe souvent dans les grandes manades plusieurs groupes de poulinières),
- les poulains mâles de l'année,
- les jeunes mâles de 2 et 3 ans,
- les pouliches (avant la mise à la reproduction),
- les montures (seulement des hongres).

Les étalons Camargue sont sélectionnés par le manadier pour être présentés à partir de 3 ans au concours d'approbation à la monte publique et ce chaque année jusqu'à l'âge de 10 ans. Ce concours comporte une présentation en main, une présentation montée aux 3 allures et un test facultatif de travail du taureau. Les échanges d'étalons se pratiquent beaucoup entre manades pour tenter de diminuer la consanguinité dans ce si petit groupe d'élevages.

Les juments poulinières sont sélectionnées par l'éleveur selon ses propres critères de conformation essentiellement. Elles sont mises à la reproduction dès l'âge de 3 ans et poulinent souvent chaque année jusqu'à leur réforme parfois très tardive (20-25 ans). Dans l'élevage traditionnel camarguais, les juments ne sont jamais montées et ne servent qu'à la reproduction. Si certaines juments ne correspondent pas aux critères sélectionnés par le manadier, celui-ci les vend à l'extérieur du berceau de la race pour la monte ou si ces juments sont trop difficiles à domestiquer, pour la boucherie.

Pour que les poulains soient reconnus « Camargue », la reproduction doit être exclusivement naturelle. Tous les poulinages ont lieu dans la manade, en toute liberté, de février à mai, souvent dans une pâture plus sèche où les poulains ne risquent pas de se noyer.

Après 7 à 8 mois de vie, à l'automne, tous les poulains de race Camargue sont marqués au fer rouge de la marque de la manade, toujours sur la cuisse gauche et de la lettre de l'année de

naissance suivie d'un chiffre. Les mâles sont marqués à l'encolure gauche pour la lettre et le chiffre, alors que les femelles, laissées libres toute leur vie, sont marquées à la croupe gauche, au-dessus de la marque de la manade, ce qui facilite la lecture de loin. Ce jour de marquage permet également d'effectuer le signalement sous la mère avec la pose d'un transpondeur électronique.

Fin novembre, la plupart des éleveurs sevrèrent les poulains mâles de l'année en les rassemblant seuls au mas pour les habituer à être attachés et manipulés. Ils sont relâchés au marais ensemble à la fin de l'hiver, parfois avec les jeunes mâles de 2 et 3 ans. Les pouliches sont également sevrées de leurs mères et séparées jusqu'à leur mise à la reproduction.

Les montures sont essentiellement des hongres, castrés dès 3 ans ou plus tardivement pour cause de réforme comme étalon. De plus en plus d'étalons sont également montés pour tester leurs aptitudes dans le travail du taureau. Les critères d'évaluation d'une monture sont la conformation, le caractère, les origines et les qualités au travail.

Un débat existe au sein des éleveurs sur le fait de débourrer certaines juments afin de les tester également au travail, faciliter la sélection des reproducteurs et améliorer la qualité des montures. Pour l'instant, la tradition prime et les éleveurs expérimentés n'ont pas besoin de recourir à ce changement de pratique pour leur sélection.

Mode de vie, activités et soins apportés au cheval Camargue

Le cheval Camargue est élevé exclusivement à l'extérieur, souvent dans les mêmes pâtures que les taureaux, soumis aux mêmes conditions climatiques, manquant parfois de nourriture et se reproduisant avec très peu d'interventions humaines. Il existe encore quelques troupeaux de chevaux Camargue quasiment sauvages dans les marais de Camargue. Ce cheval est tout de même rentré à l'écurie, pendant les phases de sevrage, débouillage ou si des soins médicaux doivent être apportés. Il supporte mal l'enfermement, surtout seul.

Pour le travail du taureau, le gardian commence à le monter dès l'âge de 3 ans et les bonnes montures sont parfois utilisées jusqu'à plus de 20 ans. Il faut remarquer la longévité moyenne importante des chevaux dans cette race, peut-être liée à sa rusticité légendaire. Les chevaux vivant paisiblement dans la manade à plus de 30 voire 35 ans ne sont pas rares (Tomas-Roux 1998).

Le cheval Camargue est une monture polyvalente, excellent cheval de randonnée, mais aussi d'endurance, d'obstacles, de complet, d'attelage et de dressage. Cette race est également très utilisée à des fins touristiques pour la promenade à cheval des touristes très nombreux à la belle saison. Les hauts lieux de cette activité se trouvent aux Saintes Maries de la Mer (foyer de cas cliniques équinés de WN en 2004) et au Grau du Roi à l'Espiguette.

Dans cette race, il a longtemps été proscrit d'intervenir trop sur la gestion de l'élevage pour la nourriture, les mesures sanitaires et le débouillage progressif. Mais aujourd'hui la plupart des éleveurs camarguais ont compris que s'ils voulaient produire des chevaux de qualité pour toute leur vie, il fallait prendre garde à certaines étapes essentielles du développement d'un cheval. Préserver les qualités de la Race Camargue et en particulier sa rusticité à laquelle ils tiennent tant, n'est absolument pas incompatible avec l'application de soins et de complémentation de la ration aux périodes critiques. La vermifugation est devenue un acte courant dans les élevages bien tenus. Par contre la vaccination n'est souvent appliquée que par obligation légale. L'alimentation varie au cours des saisons : le jonc est la nourriture de base du printemps à l'automne dans les marais (« pays d'été »), alors que l'hiver les chevaux sont transportés si possible sur des terres moins salées et herbeuses (« pays d'hiver »). Si l'éleveur ne dispose pas de telles terres, les chevaux reçoivent du foin en quantité. Au cours de mes enquêtes, j'ai été confronté la plupart du temps à des chevaux en excès d'embonpoint, bien plus que dans la population équine générale.

Comme le remarquait Mr Guy Bideault, ancien directeur du haras d'Uzès, lors de la reconnaissance officielle de la race Camargue en 1978, à propos du cheval Camargue, c'est « sans doute parce qu'en lui s'incarne toute la Camargue qu'on donne à ce cheval le substantif Camargue et non l'adjectif camarguais » !

c) Démographie de la population équine dans la zone d'étude principale

Les renseignements bibliographiques ou statistiques sur la population de chevaux vivant en région de Camargue sont très épars et souvent imprécis, comme le sont ces mêmes données en France globalement. L'obtention de données fiables dans ce domaine constitue un casse-tête pour les scientifiques menant des études sur la population équine. Les études épidémiologiques nécessitent la connaissance du dénominateur de la population étudiée.

Celui-ci est connu pour la plupart des espèces animales domestiques, sauf le cheval. Dans cette espèce, l'identification est devenue obligatoire pour tous les Equidés seulement depuis le 1^{er} janvier 2008 et les sanctions pour une absence d'identification sont encore très rares et freinent l'application de cette mesure. D'autre part, le cheval est surtout un animal de sport et de loisir, donc moins concerné par la traçabilité obligatoire pour les animaux de rente. Enfin la filière est très cloisonnée avec une multitude d'acteurs qui ont beaucoup de mal à s'entendre et se fédérer.

En plus des problèmes généraux rencontrés en France, en région Camargue, l'identification des chevaux a longtemps été négligée du fait de l'élevage extensif de la race Camargue et de l'utilisation de beaucoup de chevaux croisés appelés aujourd'hui « d'origine non constatée ».

Ainsi il est à l'heure actuelle impossible d'obtenir le nombre exact de chevaux dans cette région. Il faut alors travailler par comparaison et recoupement de différentes sources statistiques et par des études de terrain longues, chères et fastidieuses.

En France, trois organismes détiennent des informations générales sur la population équine :

-le S.I.R.E. (Système d'Information Relatif aux Equidés) géré par les Haras Nationaux, permet chaque année et par département au minimum, de connaître le nombre de poulinières (estimé par le nombre d'élevages multiplié par le nombre moyen de poulinières par élevage), le nombre d'étalons, le nombre d'immatriculations des poulains de l'année et des chevaux d'origine non constatée (ONC) (disponibles en ligne sur <http://www.haras-nationaux.fr/portail/particuliers/sinformer/statistiques-et-economie/chiffres-de-lelevage.html>, consultés le 27 juillet 2010).

- le SCEES (Service Central des Enquêtes et Etudes Statistiques) du MAAP (Ministère de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Pêche) a organisé le dernier recensement agricole en 2000 (Un nouveau recensement agricole va être effectué de septembre 2010 à avril 2011). Ce recensement permet de connaître le nombre de juments poulinières et autres équidés (tous confondus) seulement dans les exploitations agricoles. D'autre part, il existe des données de SAA (Statistiques Agricoles Annuelles) établies par les services statistiques des DDAF (Direction Départementale de l'Agriculture et de la Forêt) et comptabilisant une fois par an (au 1^{er} novembre) l'effectif d'équidés présents dans un échantillon aléatoire d'exploitations agricoles. Trois catégories d'équidés sont recensés : chevaux de selle, sport, loisir et course (+ poneys) / chevaux lourds / ânes, baudets, mules, mulets, bardots. Ces données sont

enregistrées par commune mais elles restent malheureusement confidentielles. Seules les données par département sont accessibles.

- la liste des établissements équestres agréés par la FFE (Fédération Française Equestre). Mais les données d'effectifs de chevaux pour chacun d'eux n'est pas disponible. Il faut estimer un nombre moyen de chevaux détenus dans ces centres. Dans l'étude de Terry en 2007, il a été estimé à 28 dans la zone qui nous intéresse (Terry 2007).

Les données chiffrées du S.I.R.E. sont disponibles à l'échelle du département et il n'a pas été possible jusqu'à présent d'obtenir des Haras Nationaux les données de population totale d'équidés déclarés par commune. D'autre part le S.I.R.E. comptabilise seulement les naissances, les juments poulinières et les étalons de races, ainsi que les nouvelles immatriculations d'ONC, mais il est impossible à un instant t de connaître le nombre exact de chevaux présents dans une zone donnée.

Il est difficile de dire si ces données surestiment ou sous-estiment la population équine car il faudrait pouvoir évaluer la part relative des données manquantes :

- les naissances de poulains non déclarés au S.I.R.E. (Système d'Information Relatif aux Equidés)
- les chevaux adultes non encore identifiés
- les chevaux morts et non déclarés
- les chevaux vendus, donnés ou déplacés dans d'autres régions.

Deux thèses vétérinaires ont permis de synthétiser les informations disponibles en 1998 et 2007 (Tomas-Roux 1998, Terry 2007). L'effectif de chevaux Camargue a été estimé à plusieurs milliers par les chercheurs en 1968 (Hoffmann et al. 1968). Tomas-Roux a estimé en 1998 que l'effectif réel de chevaux Camargue seulement, vivant dans le berceau de race (c'est-à-dire une zone un peu plus large que notre zone d'étude), était proche de 1400 chevaux (Tomas-Roux 1998).

Les tableaux I et II présentent les principaux résultats de l'étude de Terry en 2007, dans le premier tableau pour les trois départements de notre zone d'étude (Hérault, Bouches-du-Rhône, Gard) et dans le deuxième tableau pour toutes les communes de la zone d'étude, avec l'hypothèse que la répartition des chevaux est homogène dans chaque département (Terry 2007).

Tableau 1: Estimation de la population équine dans les trois départements d'intérêt (Terry 2007) :

Dans le Gard, Hérault et Bouches-du-Rhône	Nombre estimé de chevaux
Données SIRE 2005	21 370
Données Recensement agricole 2000 + Données FFE	19 175
Données SAA 2004 + Données FFE	18 712

Tableau 2: Estimation de la population équine dans la zone d'étude (Terry 2007) :

Zone d'étude	Nombre estimé de chevaux
Données SIRE 2005	4 070
Données Recensement agricole 2000 + Données FFE	4 546
Données SAA 2004 + Données FFE	3 547

Après prise en compte des différents biais, Terry estime la population totale dans les trois départements considérés à 20 000 chevaux environ et dans la zone d'étude à 4 500 (Terry 2007).

Une autre méthode permettant de s'affranchir des contraintes et biais des études décrites précédemment et valable uniquement si la majorité de la population équine est logée à l'extérieur, est le comptage par vol aérien, en avion léger à basse altitude. Ce comptage peut être exhaustif dans une surface délimitée au sol ou par échantillonnage. Cette dernière méthode consiste à compter le nombre d'animaux présents dans une certaine largeur de bande de comptage située entre deux repères sur l'avion et dont la surface correspondante au sol est mesurée à l'avance. Il existe plusieurs sources d'erreurs liées au pilotage (altitude de vol non constante par exemple) ou au comptage des individus (densité de groupes trop importante, manque de visibilité, fatigue de l'observateur...). Les avantages sont la rapidité, la couverture d'une grande zone d'exploration, la facilité d'accès à tous les milieux.

Ce type de recensement a été mis en œuvre dans notre zone d'étude par Terry en 2007, mais n'a pas permis d'obtenir de résultats précis et fiables, essentiellement par manque d'expérience sur cette méthode (Terry 2007). Il serait certainement très informatif de renouveler le comptage par cette méthode, en l'absence d'autres données.

En conclusion de ce paragraphe, il apparaît très clairement qu'il est encore extrêmement difficile d'obtenir le nombre exact de chevaux dans une zone donnée à un instant t. Mais dans l'avenir, nous devrions pouvoir obtenir des données plus fiables pour trois raisons principales :

-L'article 38 de la loi rurale du 23 février 2005, correspondant à l'article L311-1 du Code Rural a requalifié juridiquement les centres équestres en tant qu'exploitations agricoles (Terry 2007). « Sont réputées agricoles toutes les activités de préparation et d'entraînement des équidés domestiques en vue de leur exploitation, à l'exclusion des activités de spectacle ». Sont donc incluses dans les activités agricoles, les activités équestres suivantes : l'élevage, la randonnée, les courses, l'enseignement de l'équitation. Sont toujours exclus de ce recensement les chevaux de loisir et les « écuries de propriétaires », dont les chevaux sont seulement logés et nourris, sans travail effectué par un professionnel. En tout cas, les effectifs en Equidés des structures maintenant qualifiées d'exploitations agricoles et jusqu'alors difficiles à quantifier devraient être systématiquement comptabilisés dans le prochain recensement agricole de 2010.

-La filière équine a pris conscience de l'importance d'une meilleure connaissance de ses effectifs, surtout d'un point de vue économique d'ailleurs. Un partenariat entre les Haras Nationaux, l'Institut de l'Élevage, les Conseils des Chevaux et/ou des Equidés et les Chambres d'Agriculture a vu le jour pour créer le réseau REFERENCEs, dont la vocation est de fournir des repères techniques et économiques fiables et actualisés dans la filière équine (<http://www.haras-nationaux.fr/portail/professionnels/sinformer/statistiques-et-economie/etudes-thematiques.html>).

-Enfin depuis maintenant plus de deux ans, l'identification de tous les Equidés est obligatoire et les propriétaires de chevaux ont de plus en plus le souci de régulariser leur situation, même pour les plus récalcitrants en Camargue !

Mais il faudra garder à l'esprit qu'actuellement, ce sont surtout les chevaux détenus par des particuliers qui sont le plus difficiles à comptabiliser. De plus l'enregistrement des décès et des déplacements restent très incomplets, ce qui nécessite la poursuite de recensements réguliers pour actualiser les données.

d) Mouvements de chevaux

Les chevaux dans la région étudiée sont amenés à être déplacés pour diverses raisons qu'il convient de bien connaître, pour savoir où ces chevaux se situent pendant l'année et notamment l'été, saison à risque pour la maladie de WN. Cette information est primordiale pour pouvoir interpréter le mieux possible les résultats sérologiques de ces animaux témoins d'un contact avec le virus WN.

Astier en 2004 a conduit une enquête de terrain dans notre zone d'étude qui s'intéressait aux caractéristiques générales des écuries de la région, comme leurs activités, leurs effectifs, mais aussi les déplacements des chevaux (Astier 2004). Grâce à cette étude et à notre propre connaissance du terrain, il est possible de décrire les motifs de déplacements des chevaux de la zone d'étude.

Reproduction (de février à septembre)

Les juments poulinières de race Camargue ou autre sont déplacées pour deux raisons majeures :

-avant les poulinaages, elles sont mises dans des pâtures plus sèches pour éviter les noyades de poulains à la naissance ou plus près des habitations pour être surveillées,

-pour les saillies, elles peuvent être déplacées dans un autre élevage au contact d'un autre étalon, parfois dans la même pâture que d'autres juments, dans un haras ou dans une pâture de leur élevage plus facile à surveiller.

Il existe également de nombreux échanges d'étalons entre élevages, pour diminuer la consanguinité.

Changement saisonnier de pâtures

Les propriétaires de cette région ont souvent deux types de pâtures : des « pays d'été » utilisés du début du printemps au début d'automne et des « pays d'hiver » pour le reste de l'année. Le choix se fait en fonction des ressources alimentaires disponibles (roseau ou herbe), de la mise en eau intermittente des pâtures utilisées à d'autres fins (roselières, rizières) et de la présence d'insectes nuisibles à certaines périodes de l'année (moustiques, tiques...) empêchant les chevaux de se nourrir correctement. L'hiver, saison difficile pour les chevaux par manque de nourriture, les chevaux sont parfois déplacés hors de la zone d'étude,

plus au Nord dans les Cévennes ou dans les Alpes. Ce déplacement évite aux propriétaires de distribuer du foin.

Transports ponctuels

Dans cette catégorie, les motifs sont multiples : promenades ou randonnées sur plusieurs jours pour le loisir ou à des fins commerciales, participation à des concours ou des spectacles, transport des montures des gardians pour le travail du taureau dans d'autres manades ou pour des festivités dans des villages de la région, participation aux salons du cheval à Montpellier, Avignon, Lyon ou Paris.

D'après cette description, il paraît souvent possible de prédire les déplacements d'un cheval en fonction de son activité et de son sexe. Pourtant il ne faudra pas négliger de collecter ces informations lors des enquêtes de terrain au même titre que d'autres informations primordiales, car les combinaisons sont multiples.

De cette partie du manuscrit, ressort la grande originalité de la région Camargue en France. Elle regroupe à la fois tous les critères favorables à l'instauration d'une enzootie du virus WN par la coexistence de conditions climatiques, géographiques, de flore et de faune optimales, ainsi que des conditions idéales à l'étude de ce virus par l'historique marqué d'événements majeurs du virus WN en Camargue et l'omniprésence du cheval. Le choix de cette zone paraissait donc naturel pour notre étude, d'autant plus qu'un groupe de chercheurs précurseurs avait déjà effectué des travaux près de 50 ans plus tôt (Panthier 1968).

C. Question de recherche et hypothèses de travail

Ce travail vise à étudier les facteurs spatiaux favorables à une circulation enzootique du virus WN en une zone donnée, la Camargue. Le choix de cette zone d'étude principale a été effectué sur la base de l'observation de circulations régulières et probablement permanentes du virus dans cette région, comme nous l'avons décrit plus haut. Nous avons donc considéré dans ce travail que la Camargue est une zone enzootique pour le virus WN en France.

Les paramètres environnementaux favorables à l'émergence de la maladie à un moment donné, comme des facteurs météorologiques (température, humidité...), des variations de la croissance de la végétation... devront être identifiés, mais nous avons considéré que leur étude devra faire l'objet d'une seconde étape du travail. En effet l'épizootie de 2000 en Camargue a montré que la répartition des cas équin n'était pas liée spécifiquement à un milieu humide ou semi-humide (Durand et al. 2002). Au contraire, la majorité des cas a été rencontrée en zone de garrigue, où la densité de vecteurs est supposée faible du fait des démoustications pratiquées chaque année par l'Entente Interdépartementale de Démoustication. L'hypothèse admise est que le virus, après une phase d'amplification en zone humide, aurait été dispersé dans des milieux plus secs, plus au Nord. Il paraît en avoir été de même en 2006 dans les Pyrénées Orientales, où les cas cliniques sont survenus en bordure de zones humides (Eloit 2006). Ainsi l'étude en deux temps des facteurs de risque environnementaux favorables à l'enzootie, puis à l'émergence du virus WN paraît justifiée, puisque les mécanismes sous-jacents paraissent dissociés dans l'espace et dans le temps.

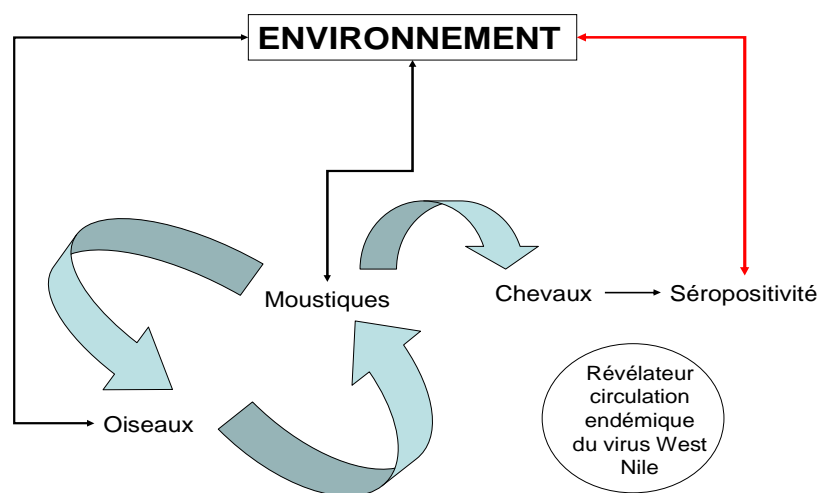
L'espèce équine a été choisie comme témoin de la circulation du virus WN. En effet le cheval est particulièrement sensible à l'infection par ce virus et est souvent considéré comme un révélateur de la circulation du virus WN (Ostlund et al. 2000, Dauphin et al. 2007).

Il développe une réponse immunitaire facilement identifiable par analyse sérologique de deux types d'immunoglobulines : les IgM et les IgG. Les IgM, révélatrices d'un contact récent avec le virus, apparaissent dans le sang dès 6 à 7 jours post-infection expérimentale (Bunning et al. 2002) et persisteraient entre 1 à 3 mois après l'apparition des signes cliniques (Ostlund et al. 2000, Davidson et al. 2005). Ces immunoglobulines sont bien adaptées pour le diagnostic d'une maladie de WN chez le cheval, mais pas pour la détection d'une circulation virale dans un effectif. Par contre les IgG restent détectables au moins 15 mois post-infection (Ostlund et al. 2001) et à l'heure actuelle les auteurs considèrent qu'elles pourraient même

persister à vie. Elles sont donc révélatrices d'un contact plus ancien avec le virus, mais sans pouvoir le dater. C'est le dosage de ce type d'IgG qui a été choisie pour nos études sérologiques dans la population équine.

La méthode que nous avons appliquée dans nos travaux est basée sur l'utilisation du lien direct existant entre l'environnement et la circulation enzootique du virus WN, par l'étude de la séropositivité chez le cheval. Cette méthode est représentée dans la figure 4.

Figure 4: Schéma représentatif de la méthode utilisée



La biologie des moustiques, mais également l'intensité des contacts moustiques-oiseaux et donc la transmission du virus WN, sont étroitement conditionnées par l'environnement. Pour estimer le risque de circulation enzootique en un lieu donné, il faut identifier les paramètres environnementaux favorables à l'enzootie, révélée par la séropositivité chez le cheval.

Nous tenterons de répondre à cet objectif en abordant plus spécifiquement la question de recherche suivante :

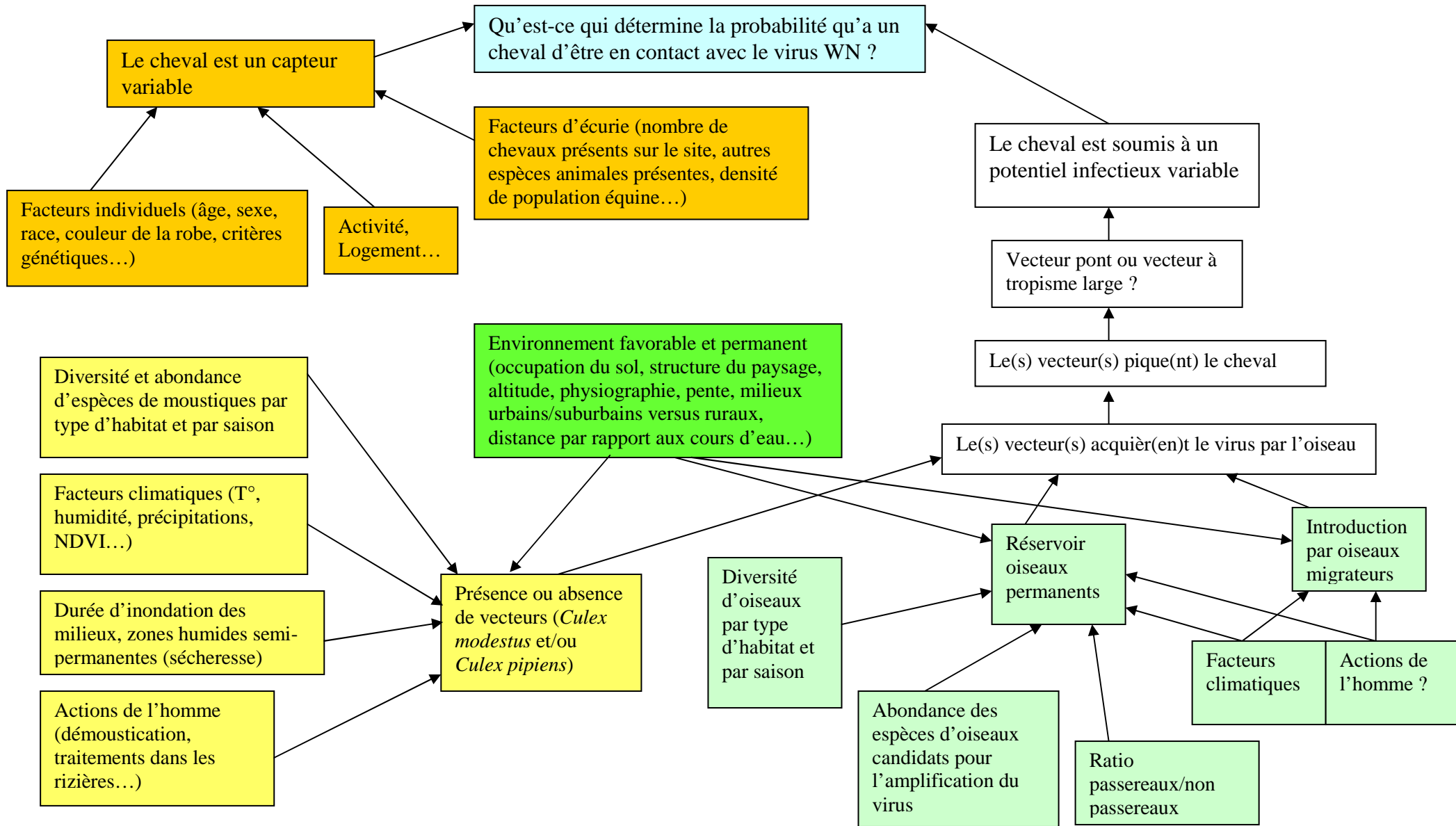
Quels sont les facteurs qui influencent la circulation du virus WN dans la zone étudiée ?

La figure 5 représente les relations entre les différents facteurs associés à la probabilité de contact d'un cheval avec le virus WN.

Nous avons fait le choix d'étudier certains de ces facteurs et les résultats de ces travaux sont présentés dans la deuxième partie.

Partie I – Problématique, contexte et question de recherche

Figure 5: Facteurs associés à la probabilité de contact d'un cheval avec le virus WN



II. TRAVAUX PERSONNELS ET RESULTATS

L'objectif de notre travail est d'évaluer la circulation enzootique du virus WN chez le cheval dans une zone d'étude principale, la Camargue, en identifiant des facteurs de risque environnementaux, mais aussi individuels. Dans cette deuxième partie, le premier paragraphe portera sur la description des données utilisées dans nos travaux personnels, les données collectées lors des enquêtes en Camargue d'une part et les données environnementales ayant servi à rechercher des facteurs de risque d'autre part.

Puis trois études sont présentées :

-la première étude porte sur l'identification de zones à risque de circulation enzootique du virus WN chez le cheval dans le Sud de la France, en s'intéressant particulièrement à la structure du paysage.

-la deuxième étude s'intéresse à l'influence de l'eau sur la circulation enzootique du virus WN, élément naturel important dans le cycle épidémiologique de ce virus. Certains facteurs de risque liés au cheval sont également identifiés.

-la troisième a pour objectif d'étudier les mécanismes de transmission du virus WN en région Camargue, en se basant sur des cartes de distribution des vecteurs et des hôtes potentiels du virus dans cette région et en les confrontant à des données sérologiques aviaires et équines.

A. Matériel et méthodes

1. Description des enquêtes en population équine en 2007 et 2008

Le recrutement des écuries s'est fait dans la base de données Camargue créée par le Pr Agnès Leblond de VetAgro Sup Campus vétérinaire de Lyon depuis 2001 (Astier 2004, Leblond et al. 2005). En avril 2007, cette base comptait 172 propriétaires qui avaient participé déjà au moins une fois à une des enquêtes sérologiques ou qui avaient eu un cheval malade, suspect d'être atteint de la maladie de WN. Plus de 1500 chevaux étaient déjà enregistrés dans la base.

Cette base de données a été mise à jour au fur et à mesure des appels passés aux propriétaires à partir de fin avril 2007. La majorité d'entre eux n'avaient pas changé de domicile et étaient d'accord pour participer à nouveau. Certains restèrent introuvables, n'avaient plus de chevaux ou ne voulaient plus participer. Il faut souligner que la participation à ces enquêtes

reposait sur le volontariat et n'était associée à aucune contrepartie financière, excepté la réception des résultats d'analyse de leurs chevaux quelques mois après le prélèvement. Pour remercier et informer ces propriétaires et les vétérinaires praticiens locaux, une réunion permettant de présenter les résultats des études antérieures et en cours a été organisée entre les deux enquêtes.

La plupart des participants se sont vraiment investis pour répondre aux questions le plus correctement possible et mettre à disposition les chevaux, parfois difficiles à attraper, loin des habitations et pas toujours coopératifs. Les propriétaires étaient informés que toutes les données collectées lors des enquêtes resteraient confidentielles, qu'ils disposaient d'un droit d'accès et de modification des données les concernant et que les résultats seraient conservés de manière totalement anonyme (Autorisation Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL) N° 792166). Ces informations étaient expliquées oralement et chaque propriétaire signait un consentement éclairé en début de visite (Annexe 2).

Pendant l'enquête 2008, l'objectif principal était de recruter de nouvelles écuries pour couvrir de façon plus homogène la zone d'étude. Ce recrutement s'est fait grâce à la participation très active d'un éleveur de chevaux de pure race Camargue qui a sollicité d'autres éleveurs. Les centres équestres agréés par la Fédération Française d'Equitation (FFE), les éleveurs inscrits au Stud Book (livre généalogique) de la race Camargue auprès des Haras Nationaux et les éleveurs membres de l'Association des Eleveurs de Chevaux de Race Camargue (AECRC) ont également été contactés.

Au cours des deux enquêtes, la même procédure a été suivie pendant les visites dans les écuries et pour la gestion des prélèvements. Un cahier de laboratoire a été scrupuleusement tenu à jour, indiquant les dates, les visites et les prélèvements effectués et / ou envoyés au laboratoire, les personnes rencontrées, les remarques et problèmes rencontrés...

Pendant chaque visite dans une écurie, plusieurs questionnaires et documents étaient remplis et signés par le propriétaire. L'ensemble des documents figurent en Annexe 2.

Toutes les informations collectées dans ces questionnaires et les résultats des analyses sérologiques ont été enregistrées dans une nouvelle base de données Access®.

Lors des visites dans les écuries, les actions suivantes étaient systématiquement effectuées :

- 1) Relever les coordonnées géographiques de chaque lieu où les chevaux étaient prélevés et le noter sur le questionnaire Exploitation (Annexe 2).

2) Pour chaque propriétaire acceptant de participer à l'étude, faire remplir et signer le consentement éclairé (Annexe 2) en deux exemplaires, en garder un exemplaire et laisser l'autre au propriétaire.

3) Réaliser les prises de sang sur plusieurs tubes :

- 2 tubes secs
- 1 tube EDTA
- Identifier les tubes au fur et à mesure : Code du cheval et date

Le code Cheval est un numéro unique à 6 chiffres : les deux premiers chiffres correspondant au numéro du vétérinaire traitant au moment de la première visite, les deux suivants au numéro de l'écurie dans la base de données créée en 2001, les deux derniers correspondant au cheval lui-même. Ce code Cheval est attribué au cheval pour toute sa vie, même s'il change de vétérinaire traitant ou d'écurie.

4) Remplir le questionnaire Cheval (Annexe 2) en même temps que les prélèvements sont effectués.

Le questionnaire Cheval rassemble des données sur chaque cheval prélevé : nom, race, âge, sexe, activité... Si le cheval était marqué par un numéro, comme tous les chevaux de pure race Camargue, celui-ci était noté en même temps que le nom pour garantir son identification lors des enquêtes successives.

5) Remplir le questionnaire Exploitation avec le propriétaire.

6) Si certains chevaux ont eu des maladies récentes, remplir le questionnaire Maladies (Annexe 2).

De retour de ces visites, les prélèvements sur tubes secs étaient laissés à sédimenter pendant 1 h à température ambiante. Les tubes EDTA étaient immédiatement congelés à -18°C. Les tubes secs étaient centrifugés à 4000 tours/min pendant 5 min, puis le sérum obtenu était

séparé dans trois tubes de 1 mL, afin de faciliter le stockage et l'acheminement ultérieur vers les différents laboratoires. Ces tubes secs étaient également stockés à -18°C.

Pour chaque boîte de tubes de sérum ou EDTA, un inventaire des tubes, identifiés seulement avec le code Cheval et la date du prélèvement, a été fourni au laboratoire d'analyse de Virologie de l'ENVA-AFSSA-INRA à Maisons-Alfort, afin d'éviter les erreurs de saisie des résultats.

Le tableau III résume les principales informations sur les enquêtes sérologiques entreprises en 2007 et 2008.

Tableau 3: Descriptif détaillé des enquêtes

	PERIODES	PROPRIETAIRES	SITES (mas, pâtures, centre équestres, marais...)	SERUMS
ENQUETE 2007	Du 03 Mai au 13 Juillet, pendant 6 semaines	84	126	643
ENQUETE 2008	Du 15 Avril au 21 Juin, pendant 6 semaines	71, dont 19 déjà visités en 2007	100, dont 30 déjà visités en 2007	700, dont 175 déjà prélevés en 2007

Plus de sites sont répertoriés que de propriétaires car un même propriétaire peut posséder plusieurs sites sur lesquels il détient ses chevaux. Certains sites peuvent être dédiés à une activité unique, par exemple la reproduction (seules les juments, leurs poulains de l'année et un étalon sont concernés), à une saison particulière ou bien tous les chevaux peuvent indifféremment être transportés d'une pâture à une autre en fonction de la pousse de l'herbe.

Les sérums équins collectés au cours des deux enquêtes ont tous été analysés pour la recherche d'anticorps IgG dirigés contre le virus WN grâce à une technique ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) de compétition. Le test employé « *ID Screen West Nile Competition* » est commercialisé par le laboratoire ID VET à Montpellier. Cette procédure d'analyse sérologique qualitative a été effectuée selon les instructions du fournisseur. Lors d'un contrôle qualité de ce test par le fournisseur, la sensibilité et la spécificité, évaluées respectivement sur 12 sérums de chevaux positifs testés et sur 200 sérums de chevaux et oiseaux négatifs testés étaient de 100 % pour les deux paramètres

(Annexe 3). De plus, ce test commercial a fait l'objet d'une validation interne par le laboratoire de Virologie de Maisons-Alfort qui a conclu à des résultats satisfaisants de sensibilité et spécificité, au moins équivalentes à la méthode de référence OIE (Office International des Epizooties) de séroneutralisation en plages de lyse (Rapport de validation interne fourni en Annexe 3).

Les résultats sérologiques des 175 chevaux prélevés en 2007 et 2008 ont été attentivement examinés. Neuf chevaux paraissaient changer de statut, 5 séronégatifs en 2007 devenaient séropositifs en 2008 et 4 devenaient négatifs. Les tests ont été effectués une nouvelle fois sur ces sérums et il s'est avéré que leur titre en anticorps variait faiblement autour du seuil de positivité du test. Comme aucune séroconversion n'a été détectée dans cet échantillon de chevaux prélevés les deux années successives et qu'aucun cas clinique équin ou humain n'a été rapporté par les réseaux de surveillance, nous avons décidé de regrouper les données sérologiques des deux enquêtes en un seul jeu de données pour les analyses statistiques, considérant qu'aucune circulation virale n'avait été mise en évidence entre les enquêtes.

2. Données environnementales utilisées

L'augmentation exponentielle de la puissance de calcul des ordinateurs et la mise à disposition facilitée d'images satellitales de grande résolution et de logiciels de plus en plus performants de traitement d'image et de système d'information géographique (SIG) ont permis ces dernières années aux chercheurs de développer de nouvelles méthodes dans l'identification des émergences et des facteurs de risque environnementaux. De nombreux articles sont publiés dans lesquels de grandes quantités de données de nature différente (données sanitaires, environnementales, démographiques...) sont rassemblées, des hypothèses ou mécanismes de transmission sont testés, puis des cartes de distribution ou de risque sont élaborées. Ces outils sont également beaucoup utilisés par les gestionnaires de crise sanitaire pour fournir une aide à la décision aux autorités publiques.

Tous ces outils sont basés sur des données spatialisées, c'est-à-dire que tous les éléments peuvent être localisés les uns par rapport aux autres. Sans cette information spatiale, il est impossible de traiter les données (Thompson et al. 2000). L'exemple le plus typique d'utilisation conjointe de ces outils est la construction de carte de dynamique de populations de vecteurs, à partir de données d'occupation du sol, météorologiques, topographiques... qui

sont disponibles selon un pas de temps plus ou moins grand (Thompson et al. 2000). Il est ainsi possible de coupler des informations dans l'espace et dans le temps, ce qui est fondamental pour étudier et contrôler des maladies infectieuses, notamment vectorielles.

Global Positioning System (GPS)

Le chercheur doit donc disposer de données géoréférencées. Si les données ne figurent pas sur des cartes conventionnelles, le seul système de géoréférencement actuellement opérationnel et accessible au grand public en continu est le GPS, système américain mis à disposition par le Ministère américain de la Défense dans les années 1980 (Duquenne et al. 2005). Il permet de localiser précisément un élément isolé grâce à l'attribution de coordonnées géographiques : la longitude (X), la latitude (Y) et l'altitude (Z). La précision actuelle d'un récepteur GPS est de 20 m maximum pour un appareil accessible facilement par le grand public, mais les données sur l'altitude sont à prendre en compte avec prudence (Duquenne et al. 2005). Tous les points sur la surface de la Terre peuvent être géoréférencés par triangulation selon le référentiel géodésique WGS 84, grâce aux informations apportées par 4 des 24 satellites en orbite autour de la Terre (Thompson et al. 2000). Ce système est très fiable, mais certains facteurs peuvent diminuer la précision intrinsèque de l'appareil. Dans certains endroits stratégiques du Monde, les signaux sont intentionnellement brouillés pour éviter une utilisation malveillante (SA = *Selective Availability*). La présence de nuages, de montagnes... peuvent perturber la réception correcte du signal par un effet de réflexion. Pour s'exonérer de ce type d'inexactitudes, il est possible d'utiliser un récepteur GPS différentiel qui corrige la position de l'élément grâce aux positions de points de contrôle déjà référencés, la précision est alors de 10 m (Thompson et al. 2000). Enfin, en 2011, le système européen Galiléo devrait être opérationnel et pourrait augmenter la précision de restitution de la position par l'utilisation d'un plus grand nombre de satellites.

Dans le cadre de cette thèse, toutes les données géoréférencées ont été obtenues grâce à un récepteur GPS standard de marque Garmin®, Etats-Unis.

Images satellitaires et données d'occupation du sol

D'autres données spatialisées fondamentales pour étudier la répartition des cas d'une maladie dans l'espace et ses facteurs de risque environnementaux sont les images acquises par les satellites d'Observation de la Terre. En effet ces images permettent d'obtenir une mesure

objective de l'occupation du sol sur de grandes surfaces, actualisée à intervalles réguliers et acquise de manière automatisée. Elles permettent de quantifier des données d'occupation du sol, de structure du paysage, de densité de tissu urbain...

Cette catégorie de satellites capture des informations environnementales également géoréférencées, selon différents types de résolution :

-temporelle : quel est la fréquence minimale de passage du satellite dans une même zone ? Elle peut varier de 30 minutes à 30 jours.

-spectrale : quelles signatures spectrales le satellite acquiert-il ? La signature spectrale est l'émission électromagnétique caractéristique d'un objet en fonction de la longueur d'onde. Par exemple chaque type de végétation possède une signature spectrale unique qui permet sa reconnaissance sur une image satellitale. La résolution spectrale dépend du nombre de canaux du capteur et de leurs largeurs de bandes.

-radiométrique : quelle gamme de contraste maximum peut-on obtenir sur cette image ? Un contraste élevé (nombre de niveaux de gris de l'image) permet de mieux différencier certains éléments de signatures spectrales proches.

-spatiale : quelle est la taille des pixels (les plus petits éléments de l'image) ? Elle peut varier de moins d'un mètre carré à plusieurs kilomètres carrés.

Le choix du satellite et donc de la catégorie d'images à utiliser est déterminé par ces différentes résolutions qui doivent être adaptées à la question posée. Un compromis est à trouver entre les résolutions, même si la résolution spatiale est souvent prépondérante dans ce choix. Par exemple, plus la résolution spatiale sera grande, moins la résolution temporelle le sera.

La taille de l'image, encore appelée « fauchée de l'image » est aussi importante à considérer car il faudra peut-être coupler plusieurs images pour couvrir toute la zone à étudier. Cette taille est dépendante des caractéristiques de l'orbite du satellite utilisé. Elle peut varier d'un hémisphère entier à un carré de moins de 100 km de côté.

L'accès aux images (prix, autorisation à demander, délai d'attente...) peut être un dernier critère à prendre en compte.

Pour nos études, le choix s'est essentiellement porté sur deux satellites très utilisés : Landsat et Spot. Leurs caractéristiques principales sont présentées dans le tableau IV (Thompson et al. 2000, Kalluri et al. 2007).

Tableau 4: Tableau comparatif des satellites Landsat et Spot

Satellites	Pays	Année de lancement	Canaux disponibles * (IR = infra-rouge)	Résolution spatiale	Résolution temporelle	Taille de l'image (km de côté)
Landsat-5 (USGS = US Geological Survey) Instrument TM (Thematic Mapper)	USA	1984	3 dans le visible 1 proche IR 2 moyen IR 1 thermique	30 m 30 m 30 m 120 m	16 jours	185
Landsat-7 (USGS) ETM+ (Enhanced Thematic Mapper Plus)	USA	1999	3 dans le visible 1 proche IR 2 moyen IR 1 thermique 1 panchromatique	30 m 30 m 30 m 60 m 15 m	16 jours	185
Spot 4 ** HRVIR = High Resolution Visible Infrared	France	1998	1 panchromatique 2 dans le visible 1 proche IR 1 moyen IR	10 m 20 m 20 m 20 m	26 jours	60
Spot 5 ** HRG = High Resolution Geometric	France	2002	1 panchromatique 2 dans le visible 1 proche IR 1 moyen IR	5 m 10 m 10 m 20 m	26 jours	60

*Visible = 0,4-0,7 μm ; Proche IR = 0,7-1,3 μm ; Moyen IR = 1,3-5 μm ; IR lointain/Thermique = 5-14 μm

**Spot = « Satellite Pour l'Observation de la Terre »

Pour obtenir des données d'occupation du sol, il est nécessaire « d'interpréter » les images, en classant selon une certaine typologie les signatures spectrales des différents milieux à identifier. Cette classification demande une expertise certaine en télédétection, couplée à la récolte de données de terrain actualisées, l'utilisation de logiciels spécifiques comme GEOIMAGE® (Géoimage, France) et un travail long et minutieux sur les images. Cette

classification pourra être non supervisée (validation *a posteriori*) ou supervisée (phases de calibration, puis de validation grâce à des données de terrain). La description de la méthode de classification supervisée est effectuée dans l'article sur l'influence de l'eau sur la circulation du virus WN en Camargue (Etude 2 : "*Influence of water on the circulation of the West Nile Virus in horses in Southern France*").

Une interprétation d'images satellitales a déjà été effectuée dans un objectif précis par la Commission Européenne à trois reprises dans le cadre du projet CORINE Land Cover (CLC). Une explication détaillée sur ce projet et les liens pour télécharger gratuitement les données sont disponibles sur le site du Service de l'Observation et des Statistiques de l'Environnement (SOeS), géré par le Ministère de l'Ecologie, de l'Energie, du Développement Durable et de la Mer (<http://www.stats.environnement.developpement-durable.gouv.fr/index.php?id=88>, consulté le 28 septembre 2010).

La base de données géographiques CLC est produite dans le cadre du programme européen CORINE (Coordination de l'Information sur l'Environnement). Ce programme a pour but de rassembler, collecter et assurer la cohérence de l'information sur l'état de l'environnement et des ressources naturelles de la Communauté Européenne (Conseil européen du 27/06/85). La continuité de ce programme et la diffusion des données sont pilotées par l'Agence Européenne pour l'Environnement (EEA). En France, le SOeS en assure la production, la maintenance et la diffusion.

Cet inventaire biophysique de l'occupation des terres fournit des données géographiques de référence pour 38 états européens et pour les bandes côtières du Maroc et de la Tunisie (superficie totale : 550 000 km² + espaces marins et limitrophes).

Une première version de la base, appelée CLC 1990, a été réalisée à partir d'images acquises entre 1987 et 1994. Une deuxième version a été utilisée dans notre étude sur la circulation du virus WN dans le bassin méditerranéen français et l'étude du paysage et de sa structure (Pradier et al. 2008) et est appelée CLC 2000. Cette base de donnée a été réalisée à partir d'images satellitales acquises en 2000 (+/-1 an) grâce au satellite américain Landsat TM (45 scènes de juin à septembre). L'échelle de travail est de 1/100 000, correspondant à une taille de pixel de 100 m. La dernière version de CLC disponible est CLC 2006, réalisée à partir d'images satellitales issue de SPOT 4 et IRS (*Indian Remote Sensing*) d'une résolution spatiale de 20 m. Cette nouvelle version est extrêmement intéressante du fait de la très bonne résolution et de la gratuité des images.

L'élaboration des cartes d'occupation du sol des 3 versions de CLC est basée sur l'interprétation visuelle des images satellitales, complétée par plusieurs autres types de données : photographies aériennes, cartes topographiques et de végétation, statistiques, connaissances locales.

La nomenclature de CLC est hiérarchisée en 3 niveaux. Le premier niveau (5 postes ou classes) correspond aux grandes catégories d'occupation du sol repérables à l'échelle de la planète : territoires artificialisés (classe 1), territoires agricoles (classe 2), forêts et milieux semi-naturels (classe 3), zones humides (classe 4) et surfaces en eau (classe 5). Le second niveau (15 classes) est utilisable pour les échelles de 1/500 000 et 1/100 000, le troisième niveau (44 classes) est utilisé au 1/100 000. La nomenclature a pour objet de décrire l'occupation du sol et porte donc sur la nature des objets et non sur l'utilisation du sol par l'homme.

L'inconvénient majeur de ce type de données, déjà finalisées, est que l'utilisateur est nécessairement à distance du processus de création et il peut en ignorer les limites et biais (Thompson et al. 2000). Ces données sont toujours accompagnées de mises en garde faites par les créateurs, qu'il faudra consulter avec attention et garder en mémoire au moment de l'interprétation.

Indices de paysage :

Un paysage peut être représenté par une carte d'occupation du sol, mosaïque de milieux différents ayant une structure spatiale définie. Cette structure spatiale des paysages joue un rôle important dans leur fonctionnalité écologique et leur diversité biologique (McGarigal et al. 2002). Les indices de paysage ont pour but de quantifier la diversité existante dans un paysage (McGarigal et al. 2002). Ils caractérisent la composition et la configuration spatiale d'un paysage, en décrivant sa richesse, son homogénéité ou au contraire son hétérogénéité, sa fragmentation...

La composition d'un paysage se réfère au nombre ou à la « richesse » des différents éléments composants le paysage étudié (nombre de classes d'occupation du sol) et à la proportion de ceux-ci, encore appelée « occurrence ».

La configuration spatiale désigne la distribution spatiale de ces éléments.

L'ensemble des deux compose la structure spatiale d'un paysage.

Il existe de nombreux indices de paysage qui ont une définition mathématique précise et sont classés par famille : indices de forme, de surface/densité/frontière, indices de connectivité, indices de diversité, etc.(McGarigal et al. 2002). Ils demandent un long temps d'extraction pour pouvoir les utiliser. Un choix doit donc être fait et les critères de sélection souvent retenus sont leur signification d'un point de vue écologique, leur simplicité d'interprétation, leur diversité (choix d'un indicateur dans chaque famille par exemple) et les corrélations fortes qu'il peut y avoir entre eux (redondance de certains indicateurs).

Ces indices sont de plus en plus populaires dans les études épidémiologiques qui s'intéressent à l'écologie et en particulier à la biodiversité (Bailey et al. 2007, Guis et al. 2007). Ils ont également été utilisés par la Commission Européenne pour analyser les interactions entre l'agriculture et l'environnement en se basant sur des cartes d'occupation du sol CLC (Publication consultable à l'adresse suivante : <http://www.ec.europa.eu/comm/agriculture/publi/landscape/index.htm> , page consultée le 29 septembre 2010).

Certains de ces indices ont été utilisés dans notre étude sur la circulation du virus WN dans le bassin méditerranéen français et l'étude du paysage et de sa structure (Pradier et al. 2008). Dans le cadre de l'étude des facteurs de risque environnementaux de la maladie de WN, une autre étude a également utilisé des indices de paysage afin d'examiner les effets de la structure spatiale des paysages sur la diffusion du virus WN par les moustiques et les oiseaux (Liu et al. 2009b).

Systèmes d'Information Géographique (SIG)

L'étape suivante est de collecter, stocker, visualiser les données, coupler d'autres données spatialisées à ces images satellitales, construire des cartes, analyser et enfin modéliser. Toutes ces fonctions peuvent être effectuées au moyen des SIG. Les logiciels utilisables peuvent être payants, comme MapInfo® (PBBI, Etats-Unis), ArcGIS® (ESRI, Etats-Unis)... ou gratuits comme Grass® ou Diva®. Les cartes ainsi construites peuvent être directement utilisées par les décideurs et gestionnaires en santé publique.

Ces SIG utilisent deux grands types de données :

-les données vectorielles : ponctuelles (ex : villes, écuries...), linéaires (ex : routes, rivières...) ou surfaciques (ex : zones urbaines, parcelles agricoles...)

-les données matricielles ou « raster » : grille composée de cellules de même taille (ou pixels) de valeurs différentes (Ex : images satellitales).

Les principaux avantages d'un SIG sont de pouvoir répéter des tâches identiques un grand nombre de fois de façon fiable et relativement rapide, de superposer des images de sources et de référentiel géographiques différents et de pouvoir les comparer et enfin d'analyser statistiquement des relations entre les données (Moore et al. 1999). Les inconvénients majeurs sont le coût parfois élevé des logiciels spécifiques et de l'ordinateur suffisamment puissant pour traiter les données, mais aussi l'expertise nécessaire pour utiliser correctement le SIG. Enfin une limite importante des SIG à ne pas négliger est qu'il est souvent difficile de représenter une distribution spatio-temporelle d'une maladie, puisque par définition les cartes représentent des données figées dans le temps (Moore et al. 1999). La question des échelles spatiale et temporelle est alors cruciale car si le choix est inapproprié, le lien entre deux facteurs pourra ne pas apparaître. Souvent il est difficile de trancher d'emblée et il est nécessaire de tester plusieurs échelles de temps et d'espace.

La finalité de la procédure est la construction d'une carte de risque ou de probabilité de présence d'un agent pathogène. En appliquant un modèle statistique de régression logistique obtenu grâce à l'analyse des données, le SIG permet de prédire la valeur de la probabilité en chaque point de la carte.

Grâce à la puissance et à l'accès facilité à ces outils, le chercheur peut obtenir des résultats impressionnants, mais il faut toujours garder à l'esprit les limites et les concessions faites pour obtenir ces résultats, dont les principales seront liées à la qualité des données en elles-mêmes, selon le principe GIGO : « *Garbage In, Garbage Out* » (Thompson et al. 2000). Si les données sont de mauvaise qualité à l'origine, l'analyse la plus sophistiquée qui soit donnera forcément des résultats de mauvaise qualité également.

« Personnes, lieux, temps » sont les trois éléments basiques dans l'investigation des épidémies et en épidémiologie en général (Moore et al. 1999). Historiquement en épidémiologie, les chercheurs se sont intéressés en premier lieu aux personnes et au temps, avec moins d'attention accordée à l'influence de l'espace, même si la cartographie des maladies a commencé depuis plus de 100 ans (Moore et al. 1999). Parfois les épidémiologistes pourraient oublier que l'analyse de la distribution spatiale d'une maladie peut donner la clé de son étiologie, comme l'a démontré John Snow au 19^{ème} siècle avec le

choléra. La convergence de facteurs, comme l'accès facilité à des images satellitales de très bonne qualité et des données épidémiologiques géoréférencées, la collaboration de plus en plus courante entre les chercheurs en télédétection et les biologistes et la possibilité d'utilisation de SIG plus performants mais aussi plus conviviaux, a créée depuis quelques années un champ fertile de recherche en épidémiologie (Kalluri et al. 2007).

L'étude d'une maladie dans l'espace est basée sur le postulat d'une distribution spatiale non homogène des cas. L'hétérogénéité de cette distribution peut permettre de découvrir le point de départ d'une épidémie, mais aussi l'influence de différents facteurs, notamment environnementaux, qu'il s'agit ensuite d'identifier.

B. Etude sur le paysage et la circulation du virus West Nile en Camargue et dans le Var

Ce paragraphe fait l'objet d'une première étude sur l'identification de facteurs de risque environnementaux favorables à la circulation du virus WN en France, basée sur des données sérologiques équines collectées en 2003 et 2004.

L'objectif principal de l'étude était d'analyser le lien direct entre des données environnementales (occupation du sol et indices de paysage) et la circulation du virus WN dans deux régions d'étude considérées comme endémiques en France : la Camargue et le Var. Depuis les années 1960, la Camargue et le Var sont des sites dans lesquels une circulation du virus WN est décrite (Joubert et al. 1970a, Joubert et al. 1970b). De plus, plusieurs épisodes récents de circulation intense du virus ont eu lieu en Camargue en 2000 et 2004 et dans le Var en 2003 (Murgue et al. 2001b, Del Giudice et al. 2004, Zeller et al. 2004a). Enfin dans le Var, la séroprévalence en IgG augmente avec l'âge des chevaux, ce qui confirme l'hypothèse d'enzootie (Durand et al. 2005).

Durand et coll. en 2005 ont avancé une hypothèse pour tenter d'expliquer pourquoi le virus WN se développe et s'entretient dans certaines régions plutôt que dans d'autres (Durand et al. 2005). Une biodiversité plus riche serait peut-être nécessaire, pour que des interactions écologiques complexes et spécifiques s'établissent entre les populations de vecteurs et de réservoirs de la maladie. Un moyen pour quantifier objectivement la structure spatiale d'un paysage et notamment une biodiversité plus riche est l'utilisation d'indices de paysages (McGarigal et al. 2002). Dans cette étude, nous présentons une analyse multivariée des données sérologiques équines obtenues dans le Var en 2003 et en Camargue en 2004. Après avoir défini des zones considérées comme enzootiques (sur la base des résultats sérologiques) et d'autres non enzootiques, nous avons cherché à caractériser ce statut en termes de classes d'occupation du sol Corine Land Cover et d'indices de paysage.

1. Résumé de l'article :

Les données sérologiques équines collectées en Camargue en 2004 et dans le Var en 2003 ont été rassemblées en un même échantillon de 1770 chevaux répartis dans 149 écuries. Ces données ont été recueillies dans un contexte comparable d'émergence de cas cliniques équins de maladie de WN et d'un point de vue spatial, dans un périmètre défini par la localisation des cas cliniques déclarés dans les deux zones. Toutes les écuries de l'échantillon étaient géoréférencées. L'analyse sérologique portait sur la recherche d'anticorps IgG dirigés contre le virus WN par un test ELISA identique pour tous les sérums. Dans l'échantillon total, 473 chevaux étaient séropositifs en IgG.

Les deux zones d'étude ont été quadrillées en mailles carrées (appelées ultérieurement cellules) de 25 km². Ce choix de taille de cellules permettait de prendre en compte l'environnement des écuries, dans un rayon assez large pour être cohérent par rapport aux déplacements réguliers des chevaux, en promenades par exemple.

Les cellules contenant moins de 5 chevaux testés (=17) ont été exclues de l'analyse, car nous avons considéré qu'il était impossible de définir leur statut de circulation virale avec si peu de données.

Les autres cellules ont été classées en deux catégories selon le nombre de chevaux séropositifs :

-« à faible circulation virale » : si aucun cheval ou un seul cheval de la cellule était séropositif (28 cellules).

-« à forte circulation virale » : si plus de 5 chevaux étaient séropositifs dans la cellule (16 cellules).

Les cellules contenant de 2 à 4 chevaux séropositifs ont été exclues de l'analyse.

Des données d'occupation du sol Corine Land Cover (CLC) 2000 ont été utilisées avec une typologie de 12 classes. Dans chaque cellule, le nombre de pixels de chacune des 12 classes a été calculé.

Cinq indices de paysage ont été choisis (nombre de classes (PR), densité de patches (PD), densité de frontières (ED), indice de diversité de Shannon (SHDI) et indice d'imbrication et de juxtaposition (IJI)) et calculés dans chaque cellule à partir des données CLC.

Une analyse multivariée par régression logistique (méthode pas à pas par minimisation du critère d'information d'Akaike) a été conduite pour identifier les variables significatives pour la circulation virale dans ces zones. Les variables significatives dans le modèle final

étaient un des indices de paysage : l'indice de juxtaposition et d'imbrication (IJI) et la classe d'occupation du sol : Zones agricoles hétérogènes. Les autres variables sélectionnées dans le modèle étaient des classes d'occupation du sol : territoires artificialisés, terres arables, cultures permanentes, forêts, milieux à végétation arbustive et/ou herbacée et zones humides maritimes. Une variable indicatrice de la zone d'appartenance de la cellule a été introduite dans le modèle final et cette variable n'a pas conduit à un meilleur ajustement du modèle.

Une validation interne du modèle final en analysant les courbes ROC des modèles initial et final (calcul des aires sous la courbe) a montré un bon pouvoir discriminant du modèle. Enfin ce modèle a été utilisé pour tracer une carte de risque de circulation du virus WN dans tout le bassin méditerranéen français. Les cellules ayant une haute probabilité d'être à forte circulation virale étaient situées en Camargue et dans le Var, mais aussi à proximité des sites où des cas humains ont été rapportés dans les années 1960 et à proximité immédiate des cas équins rapportés en 2006 dans les Pyrénées Orientales. Une zone intermédiaire entre les deux zones d'étude, près d'Aix-en-Provence, paraissait également à risque, zone dans laquelle aucune étude sérologique sur le virus WN n'a été menée jusqu'à présent.

2. "Land Cover, Landscape Structure, and West Nile Virus Circulation in Southern France »

Cette étude a fait l'objet d'un article dans la revue *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, publié en 2008, qui est intégré directement au texte.

Land Cover, Landscape Structure, and West Nile Virus Circulation in Southern France

S. PRADIER,^{1,2} A. LEBLOND,^{1,3} and B. DURAND⁴

ABSTRACT

The transmission of West Nile virus (WNV) is strongly influenced by environmental factors. In France, two endemic areas for WNV have been identified: Camargue and Var. The objective of our study was to test whether landscape characteristics could be associated with the risk of endemic circulation of WNV in these two ecologically different areas. Equine serological data collected during outbreaks in Var (2003) and Camargue (2004) were used. Both areas were marked out in cells of 5 km², and data were aggregated for each cell. Sixteen cells, classified as "high" level viral circulation, and 28 cells, classified as "low" level viral circulation were used for the analysis. The Corine Land Cover database (European Environment Agency) was used to evaluate, for each geographic cell, the area covered by 12 land cover classes, as well as the value of 5 landscape metrics (patch richness and density, edge density, the Shannon's diversity index, and interspersed and juxtaposition index (IJI)). Multivariate linear generalized regression showed that IJI as well as the surface covered by heterogeneous agricultural areas were significantly higher in high level WNV circulation cells than in low level ones ($p = 0.01$ and 0.05 respectively). Both variables are indicators of a complex spatial biotope configuration that may favor the co-existence of competent vectors and reservoir hosts: the structure of the landscape thus appeared as a key element in WNV circulation. An internal validation was performed and the model was used to compute a risk map for the French Mediterranean coast. Cells with a probability > 0.8 of having a high level of viral circulation were found near Aix-en-Provence, Beziers, and Perpignan, areas where no serological study has yet been conducted. Equine cases reported in 2006 were all located in the neighborhood of cells having a > 0.8 probability for high WNV circulation status. Key Words: Epidemiology—West Nile.

INTRODUCTION

WEST NILE VIRUS (WNV) is a Flavivirus (family: *Flaviviridae*) transmitted by mosquitoes to birds, the reservoir hosts (Zeller and Schuffenecker 2004). Humans and horses are incidental dead-end hosts. This epidemiologic cycle is complex and deeply influenced by environmental conditions.

In the United States, WN fever became a serious public health problem beginning in 1999, with significant numbers of human and equine

clinical cases arising after 2000 (e.g., 9,000 human cases and more than 4,000 equine cases in 2003 in the USA). The disease has spread very quickly across the Western Hemisphere (Hayes et al. 2005) and has been isolated in many European countries, including France, Spain, Portugal, Russia, the Czech Republic, Romania, and Italy. In France, circulation of WNV was first described in the 1960s in two neighboring zones located on the Mediterranean coast: Camargue and Var (Joubert et al. 1970a and 1970b). More recently, outbreaks were recorded in

¹UMR CNRS 5525 TIMC, Unit Environnement et Prévisions de la Santé des Populations, Université J. Fourier, Grenoble, France.

²Clinique Equine, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France.

³Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Département Hippique, Marcy L'Etoile, France.

⁴Unité d'Epidémiologie, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Maisons-Alfort, France.

Camargue in 2000 (Murgue et al. 2001) and 2004 (Leblond et al. 2007), as well as in Var in 2003 (Mailles et al. 2003, Del Giudice et al. 2004). The most recent French cases were also reported from the Mediterranean coast in September 2006, near the Spanish border (OIE immediate notification, September 29, 2006).

Camargue is an alluvial plain that corresponds to the delta of the Rhone River. It presents diversified environments (wetlands but also cultivated areas) favorable to both mosquito vectors and populations of birds (Blondel and Isenmann 1981, Hoffmann et al. 1968). In some parts of Camargue more than 30% of horses were IgG-WNV positive after the 2000 outbreak, and this area was considered to be at risk of frequent WNV circulation (Durand et al. 2002, Leblond et al. 2007). The ecology of Var is in sharp contrast to that of Camargue. This dry and mountainous area is mainly occupied by two crystalline massifs with dense vegetation (Maures and Esterel), separated by a cultivated alluvial plain. A serosurvey conducted in a horse population in 2003 showed a high anti-WNV IgG seroprevalence (33.7%) associated with an increase in IgG seroprevalence with the age of horses in some stables (Durand et al. 2005). As for Camargue, it is probably an area where WNV circulates frequently.

Geographic information systems and remote sensing technologies have been used in Camargue to identify biotopes associated with WNV transmission in horses: higher proportions of dry bushes, open water, and woodlands in the vicinity of animals were identified as risk factors for WNV cases. These biotopes are favorable for the presence of birds and could represent areas of a higher contact rate among mosquitoes, reservoirs, and accidental hosts (Leblond et al. 2007). In Var, a geographical analysis showed a close association between equine immunoglobulin G (IgG) seroprevalence and the proximity of two IBAs (important bird areas). It was hypothesized that these areas, protected for their enriched avifauna, also probably present a higher biodiversity that could favor frequent WNV circulation (Durand et al. 2005).

Landscape ecology connects biotope analysis with biodiversity through the elaboration and use of landscape metrics for biodiversity

assessment (Schindler et al. 2007). These metrics quantify the two major components of a given landscape: the compositional component, which refers to landscape richness (number of land cover types in a landscape) and evenness (proportion of each land cover type), and the structural component, which refers to spatial configuration of landscape elements (McGarigal and Marks 1995).

The principal objective of the present study was to analyze the link between the landscape metrics and WNV circulation in two regions of southern France, Camargue and Var. It was postulated that a richer environmental biodiversity would increase the probability of contact between competent vectors and hosts. Landscape metrics would then be linked with WNV circulation. Land cover data were extracted from the general-purpose CORINE (Coordination of Information of the Environment) database. Previous studies have used this database to compute landscape metrics for the analysis of interactions between agriculture and environment (European Commission 2007).

MATERIALS AND METHODS

Serological data

In Camargue (2004) and Var (2003), equine sera were collected from stables georeferenced with a global positioning system (GPS), around the sites of clinical cases (human and/or horses) confirmed by a WNV neutralization test. Sera were processed and tested for anti-WNV IgG using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), as described by Murgue et al. (2001).

The two geographic areas were cut into 25 km² cells, the size of which (5 × 5 km) was chosen in accord with usual horse movements (e.g., for trail rides). For each of the 79 geographic cells containing at least one stable, individual equine IgG serological results were then aggregated: in the 52 cells that contained at least one seropositive animal, the average seroprevalence was 28.7% in both Var and Camargue (Table 1). Aggregated serological results were then used to compute a cell status. Seventeen cells with < 5 tested horses were ex-

TABLE 1. SEROLOGICAL DATA FROM CAMARGUE (2004) AND VAR (2003) AGGREGATED IN 25 KM² CELLS AND CELLS CLASSIFICATION FOR WEST NILE VIRUS (WNV) CIRCULATION

	Camargue 2004	Var 2003
Cells with > 1 tested horse		
Number of cells	57	22
Average number of stables	1.9	1.9
Average number of tested animals	15	41
Cells with > 1 IgG-positive horse		
Number of cells	33	19
Average anti-WNV IgG seroprevalence	28.7%	28.7%
Low WNV circulation cells ^a		
Number of cells	18	10
Average anti-WNV IgG seroprevalence	4.3%	4.5%
High WNV circulation cells ^b		
Number of cells	7	9
Average anti-WNV IgG seroprevalence	35.1%	52.8%

^a≤ 1 seropositive horse and > 5 tested animals.

^b> 5 seropositive horses.

IgG, immunoglobulin G.

cluded from further analysis, as available information was considered insufficient for any classification. The status of the 62 remaining cells was then defined according to rules based on number of seropositive animals, instead of proportions, to take into account cells with few animals tested (5–10 horses):

Cells with no positive animal ($n = 13$) as well as cells with a single reactor ($n = 15$) were considered “low WNV circulation” cells, as the presence of a single reactor may be attributed to movements of the animal outside the cell rather than to a significant WNV circulation inside the cell. Average seroprevalence for these 28 cells was 4.4% (95% confidence interval: 2.4%–6.4%). The highest seroprevalence was 16% (a single reactor among 6 tested horses).

Cells with ≥ 5 positive horses were considered “high WNV circulation” cells ($n = 16$): the simultaneous contamination of 5 animals outside the cell as a result of movement of horses appeared unlikely, whereas significant WNV circulation inside the cell became the most plausible explanation. Average seroprevalence was 45.1% (95% confidence interval: 34.1%–56.1%). All of these cells but two had > 20% seroprevalence, and all were above the 10% level, with the lowest seroprevalence at 11% (10 positive animals of 88) and the highest seroprevalence at 94% (33 positive animals of 35).

Finally, to avoid misclassification, the remaining 35 cells with 2–4 positive animals were

excluded from the analysis, because evidence for or against a significant WNV circulation inside the cell was considered insufficient.

Environmental data

Environmental data were derived from the CORINE Land Cover 2000 (CLC2000) database, provided by the European Environment Agency (EEA, 2007). The working scale was 1:100,000, corresponding to a resolution of 100 m; thus every cell of 5×5 km defined for our study contained 2,500 pixels. The CLC2000 database is the result of the European CORINE and IMAGE programmes (IFEN 2007), and it is based on images acquired by the Landsat-7 ETM satellite in 2000 (± 1 year). Raw satellite images were first pre-processed and enhanced to yield a geometrically correct document (satellite image map) in the national projection for each of the 29 participating countries. After training of the national teams, a computer-assisted photo-interpretation was conducted by each team to classify images according to a pre-defined and uniform 44-class nomenclature. The resulting database was finally validated using independent data: the LUCAS project (Land Use and land Cover Area frame Sampling) collected photos of the landscape at approximately 10,000 points. The observed land covers were then compared with the corresponding values stored in the database.

TABLE 2. COMPARISON OF HIGH AND LOW WEST NILE VIRUS (WNV) CIRCULATION CELLS FOR AVERAGE VALUE OF LANDSCAPE METRICS (PD, PR, ED, SHDI, AND IJI) AND FOR THE PROPORTION OF CELL SURFACE COVERED BY LAND COVER CLASSES (C1–C12)

Landscape metrics and land cover classes		Cell status for WNV circulation		
		High ^a	Low ^b	p Value ^c
PR	Patch richness	6.5	5.6	0.08
PD	Patch density	1.0	1.0	0.38
ED	Edge density	24.8	21.7	0.24
SHDI	Shannon's diversity index	1.3	1.2	0.07
IJI	Interspersion and juxtaposition index	46.8	39.2	0.01
C1	Artificial surfaces	8.2%	8.8%	0.97
C2	Arable land	15.4%	14.8%	0.68
C3	Permanent crops	15.3%	15.7%	0.27
C4	Pastures	0.0%	0.2%	0.48
C5	Heterogeneous agricultural areas	19.0%	13.4%	0.15
C6	Forests	19.0%	16.8%	0.56
C7	Shrub and/or herbaceous vegetation	9.4%	10.2%	0.49
C8	Open spaces with little or no vegetation	0.5%	0.4%	0.52
C9	Inland wetlands	0.6%	0.9%	0.62
C10	Coastal wetlands	9.3%	9.0%	0.77
C11	Continental waters	1.2%	1.6%	0.41
C12	Marine waters	1.8%	3.2%	0.86

^a> 5 seropositive horses.

^b≤ 1 seropositive horse and > 5 tested animals.

^cWilcoxon's tests.

The 44 classes of CLC2000's nomenclature aim at describing land occupation and are organized into a general-purpose three-level hierarchy. For our study, the second level of this hierarchy was used, except for classes 1.1 through 1.4, which were combined to a single class named "artificial surfaces." Twelve land cover classes were retained for analysis (Table 2, Fig. 1). The corresponding land cover data were aggregated at the cell level. The large ecological differences between Camargue and Var became apparent from comparison of the corresponding cells: Camargue cells contained significantly more arable land (Wilcoxon's test: $p = 0.002$), inland wetlands ($p = 0.004$), coastal wetlands ($p = 0.0004$), and marine waters ($p = 0.004$). In comparison, Var cells included significantly more artificial surfaces ($p = 0.04$), forests ($p < 0.0001$), shrub and/or herbaceous vegetation associations ($p = 0.007$).

For each cell, five landscape metrics were computed (Table 3, Fig. 2) (McGarigal and Marks 1995): (1) patch richness (PR) and (2) patch density (PD), which respectively quantify landscape composition for the number of patch types (i.e., land cover classes) and for the number of patches (adjacent pixels that share

the same land cover class); (3) edge density (ED), which is complementary to PD as it measures the complexity of the patches' shape; (4) the Shannon's diversity index (SHDI), which is a more composite metric that quantifies both the number of different patch types and the proportional area distribution among patch types; (5) finally, the interspersion and juxtaposition index (IJI), which is also a composite metric that explicitly takes into account the spatial configuration of patch types, through the neighborhood relations between patches. The IJI measures the extent to which patch types are interspersed—i.e., equally bordering other patch types. As for land cover data, landscape metrics reflected ecological differences between Camargue and Var, PD and ED being significantly higher in Var (Wilcoxon's test, $p < 0.0001$), which clearly indicates a more fragmented landscape in Var (Fig. 2).

Statistical analysis

A bivariate analysis was conducted to compare the land cover and the landscape metrics between high and low WNV circulation cells. A logistic model was used to identify variables

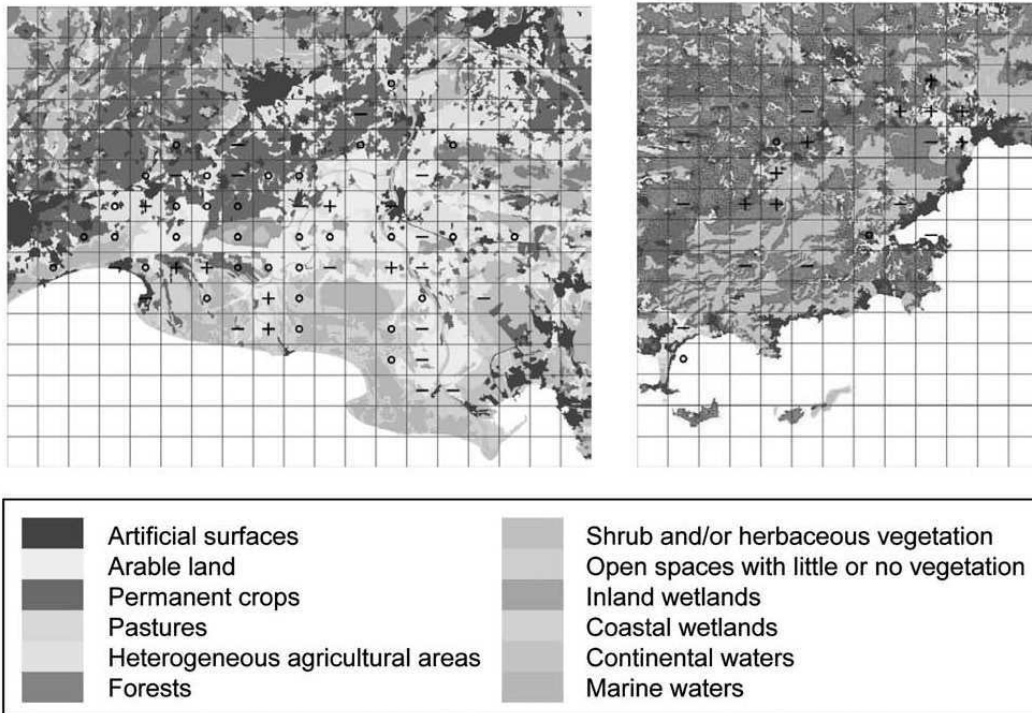


FIG. 1. Land cover in Camargue cells (left), in Var cells (right), and cell status for WNV circulation (plus signs: high WNV circulation cells; minus signs: low WNV circulation cells; circles: other cells where horses have been tested; no symbol: cells without tested animals).

that were involved in the level of viral circulation, and a correlation matrix was computed for selecting variables included in the model. In the case of highly correlated variables pairs (Pearson correlation coefficient > 0.80), the one with

the less significant value (bivariate analysis) was excluded from further analysis to avoid co-linearity. Then, a descending stepwise regression allowed us to minimize the Akaike Information Criterion (AIC) (Akaike 1973). For each variable

TABLE 3. DEFINITION OF THE LANDSCAPE METRICS

Landscape metric		Definition	Unit	Range
PR	Patch richness	$PR = n$	#classes	≥ 0
PR	Patch density	$PD = 100 n/A$	#patches/100 ha	≥ 1
ED	Edge density	$ED = E/A$	m/ha	≥ 0
SHDI	Shannon's diversity index	$SHDI = -\sum_{i=1}^m (P_i * \ln P_i)$	None	≥ 0
IJI	Interspersion and juxtaposition index	$IJI = \frac{-\sum_{i=1}^m \sum_{j=i+1}^m \left[\left(\frac{E_{ij}}{E} \right) * \ln \left(\frac{E_{ij}}{E} \right) \right]}{\ln \left(\frac{m(m-1)}{2} \right)}$	Percentage	0-100

n: number of land cover classes in the area, m: total number of land cover classes in the nomenclature, A: surface of the area (hectares [ha]), E: total length of edges (m), E_{ij} : total length of edge between land cover classes i and j (m), P_i : proportion of the area covered by land cover class i.

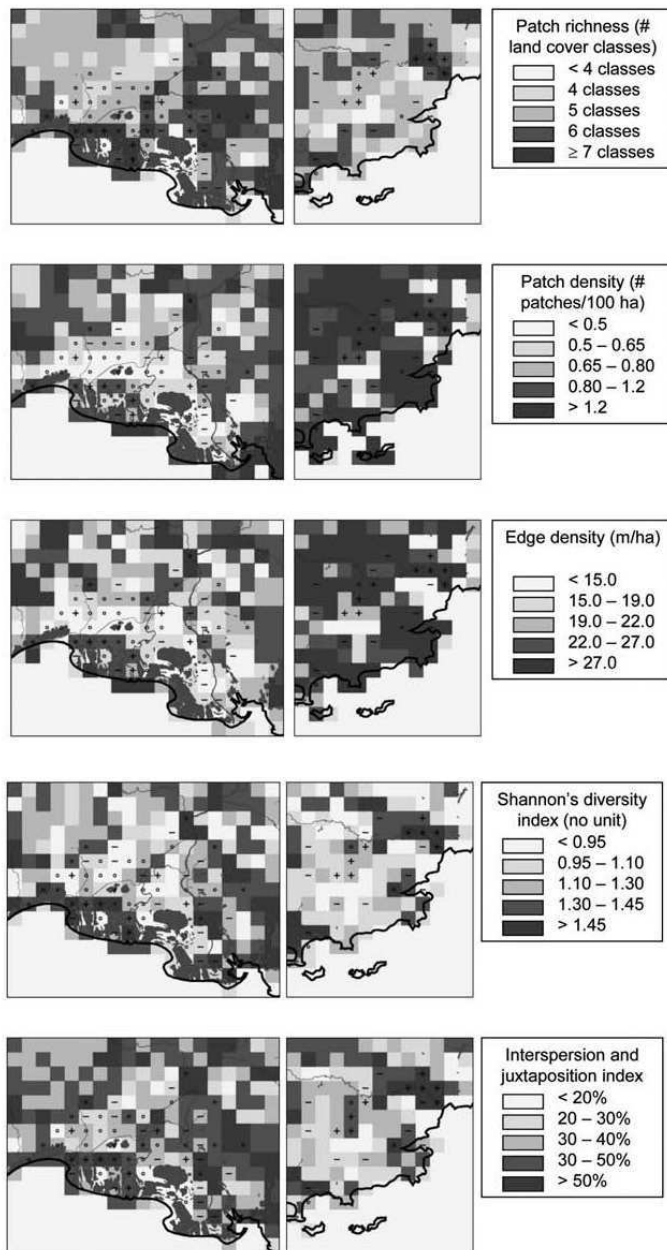


FIG. 2. Value of the landscape metrics in Camargue geographic cells (left) and Var cells (right) (classes are defined according to the 20th, 40th, 60th, and 80th percentiles of the distributions), and cell status for WNV circulation (plus signs: high WNV circulation cells; minus signs: low WNV circulation cells; circles: other cells where horses have been tested; no symbol: cells without tested animals).

remaining in the final model, odds ratios were computed for a 5% variation of the value.

Model evaluation first aimed at evaluating potential differences in fit quality between Var and Camargue cells: an indicator variable (1 for Camargue and 0 for Var) was added to the fi-

nal model, and the two models (with and without the indicator variable) were compared by means of a likelihood ratio test. The extent to which the final model captured aggregation determinants for cell status was then evaluated using the Moran's test (Cliff and Ord 1981).

Internal validation was based on a ROC (receiver operating characteristics) analysis in which ROC curves were drawn for the initial and final models and the area under the curve (AUC) was computed. The AUC variable is used to evaluate the quality of a classifier: a random classifier has an AUC of 0.5, whereas an ideal classifier has an AUC of 1. Sensitivity of fit quality to the data was evaluated with a “leave one out” approach. This method, based on re-sampling, is used for estimating generalization error when datasets are small (Dohoo et al. 2003). For each cell, a partial dataset was computed, eliminating this cell. Logistic regression was conducted for each of these partial datasets, as well as for the ROC analysis. An AUC figure was thus obtained for each of the partial datasets. The mean of this distribution of AUCs was eventually compared with the AUC obtained with the whole dataset.

Finally, the final model was used to compute a risk map for high WNV circulation along the French Mediterranean coast. Geographic variations of the predicted probabilities were compared with the location of human cases described in the 1960s (Panthier et al. 1968) and with the location of equine cases reported in 2006 (S. Zientara, personal communication).

The R package (R Development Core Team 2006) was used for all statistical analysis.

RESULTS

The IJI was significantly higher in high WNV circulation cells (Wilcoxon’s test, $p = 0.01$). At a threshold of 10%, both the PR and the SHDI were also significantly higher in high WNV circulation cells (Wilcoxon’s test; $p = 0.08$ and $p =$

0.07, respectively) (Table 2). No significant association was observed between land cover classes and cell status for WNV circulation.

The SHDI and IJI appeared strongly correlated, as were the PD and ED (Pearson’s correlation coefficient: 0.86 and 0.82, respectively). To avoid co-linearity, SHDI and PD were excluded from further analysis. Predictive variables included in the initial model were as follows:

- landscape metrics: PR, ED, and IJI;
- land cover classes: all 12 classes, except C4 (pastures) and C8 (open spaces with little or no vegetation), which were present in only very few cells (1 and 9 cells, respectively, out of 44) and at a very low level (155 and 483 pixels, respectively, out of 110,000).

The AIC of the initial model was 65, it decreased to 57 for the final model. Two variables of the final model were associated with significant regression coefficients: IJI and C5 (heterogeneous agricultural areas) (Table 4). The odds ratio corresponding to a 5% variation of IJI was 2.7 (95% confidence interval [CI]: 1.4–7.2). An increase of 125 pixels (5% of a cell’s surface) of the area covered by C5 in a given cell led to an odds ratio of 4.5 (95% CI: 1.5–27.6).

Incorporating an indicator variable in the final model to link each cell with its geographic area (Camargue or Var) did not lead to a significantly better adjustment (likelihood ratio test: $p = 0.09$), suggesting similar fit quality in both areas. High WNV circulation cells appeared significantly aggregated (Moran’s I: 0.25; $p = 0.02$), but this aggregation disappeared in regression residuals (permutation test with 10,000 permutations: estimated Moran’s I: 0.16;

TABLE 4. LOGISTIC MODEL RESULTING FROM THE STEPWISE REGRESSION PROCEDURE

Landscape metrics and land cover classes		Estimated coefficient	Wald’s test p value
IJI	Interspersion and juxtaposition index	19.816	0.01
C1	Artificial surfaces	0.08	0.15
C2	Arable land	0.011	0.08
C3	Permanent crops	0.012	0.06
C5	Heterogeneous agricultural areas	0.012	0.05
C6	Forests	0.011	0.06
C7	Shrub and/or herbaceous vegetation	0.010	0.08
C12	Marine waters	0.014	0.05
	Intercept	−35.904	0.04

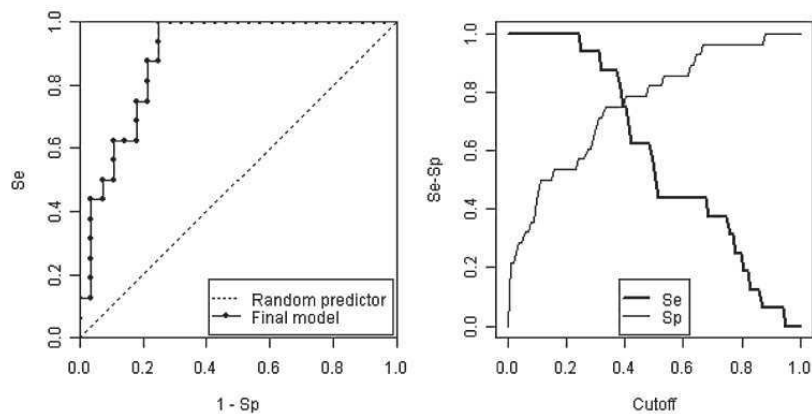


FIG. 3. ROC analysis of the final regression model: ROC curve (left) and sensitivity-specificity graph (right).

$p = 0.10$), indicating that the final model captures the main determinants of high WNV circulation cells aggregation.

The area under the ROC curve (Fig. 3, left) was 0.85, indicating a relatively good discrimination ability of the model. The model computes probabilities for a cell to have a high WNV circulation status. Computing sensitivity and specificity of this prediction for various probability cut-offs (Fig. 3, right) clearly showed that at a decision threshold of 0.4, sensitivity and specificity reached a value of 80%.

The average AUC obtained from the 44 partial datasets constructed in the "leave-one-out" procedure (one dataset per cell) was identical to the AUC obtained with the whole dataset (0.85), suggesting that applying the model to observations other than those of the dataset should lead to a similar level of prediction quality.

A risk map was computed for the entire French Mediterranean coast (Fig. 4). Cells with significant probability of a high level viral circulation status were located in Camargue and

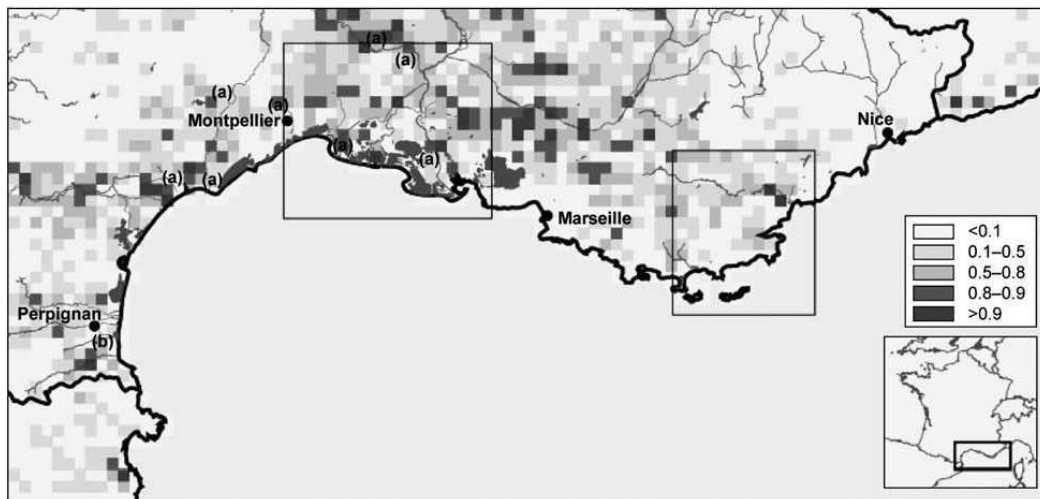


FIG. 4. Geographical variations along the French Mediterranean coast of the predicted probability for a cell to have a high WNV circulation status and approximate location of (a): human cases described in the 1960s (Panthier et al., 1968) and (b): equine cases reported in 2006.

in Var, but also at an intermediate distance between the two zones, near Aix-en-Provence, an area in which no serological study has been yet conducted. Human cases described in the 1960s were all located within, or in the neighborhood of, cells having a > 0.8 probability for having a high WNV circulation status. This was also the case for equine cases reported in 2006 near Perpignan (Fig. 4).

DISCUSSION

The research in the present study sought to analyze the links between the landscape characteristics (composition, structure) and WNV circulation. A high WNV circulation level may correspond either to an enzootic status or to virus reintroductions. In our study viral circulation was evaluated through IgG serological results in horses. These data do not allow us to distinguish an intense but occasional viral circulation from a lower but more persistent circulation. However, in Var, IgG seroprevalence increased with the age of the sampled horses (Durand et al. 2005), and in Camargue, equine clinical cases have been regularly reported since 2000 (Murgue et al. 2001, Leblond et al. 2007). These two observations suggest a frequent viral circulation rather than an occasional one. The fact that equine clinical cases were described in the 1960s from both of these areas (Joubert et al. 1970a and 1970b) also supports this hypothesis.

Landscape characteristics (land cover and landscape metrics) were quantified using the CLC2000 database. Primary satellite images used to build this database have been acquired recently (in 2000) with a spatial resolution (100 m) adapted to the objectives of the present study. Furthermore, only features that are relatively stable in time are mapped in the database: CLC2000 is not interested in diurnal changes (tide), seasonal changes (e.g., vegetation cycle), or short-term changes (e.g., flooding). This feature is in agreement with the study of the environmental conditions associated with an endemic (rather than epidemic) WNV circulation. CLC2000 finally presents the advantage of having been validated and standardized over all the European Union, which

allowed us to build a risk map for the whole French Mediterranean coast.

It is generally accepted that landscape metrics, because of the overall effects of landscape structure, provide a useful quantification of variations in biodiversity or species richness (Bailey et al. 2007). In particular, species richness of mobile animal groups (e.g., birds) has been linked to landscape heterogeneity (Bailey et al. 2007). Some landscape metrics are rough indicators for several biological groups (e.g., PD), others express a finer scale of species richness (e.g., PR or SHDI), and still others work at an intermediate scale (e.g., ED) (Bailey et al. 2007). Vector and host species (as well as parasites) participate to biodiversity, and landscape metrics could thus reflect parasite circulation and risk of vector-borne disease. Browstein et al. (2005) showed a positive link between fragmentation of the suburban landscape and entomological risk for lyme disease (tick density and infection prevalence in ticks). Jackson et al. (2006) obtained similar results: half-forested landscapes with a large percentage of forest/herbaceous edges (high interspersed of land cover classes) were statistically associated with the highest Lyme disease rates.

Our results suggest similar correlations for WNV circulation. Statistical analysis showed a significant association of WNV level of circulation with IJI and with the surface area covered by heterogeneous agricultural areas. Both parameters appear convergent: pixels of this land cover class represent small agricultural plots sometimes interrupted by natural spaces. Similarly, IJI measures the degree of interweaving of land cover classes (McGarigal and Marks 1995) and is maximal when every class represented in a landscape shares a common border with each of the others. Both variables are thus indicators of a complex spatial configuration that may favor the relation of competent vectors and reservoir hosts.

This assumption does not necessarily mean that the infection risk increases for the incidental hosts (i.e., horses and humans), because increased biodiversity may also induce a dilution effect for vector-borne diseases. A proposed reason is that vectors take only a limited number of blood meals in their life. When, because of increased biodiversity, many of these

meals are taken from hosts that are not competent to amplify the pathogenic agent, transmission risk is reduced (Dobson et al. 2006). This dilution effect appears to exist for several vector-borne diseases, such as malaria or Lyme disease, as well as for West Nile Fever in the USA (Dobson et al. 2006, Ezenwa et al. 2006, Ostfeld and Keesing 2000).

The dilution effect induced by increased biodiversity might explain the relatively low level of equine clinical cases of WN fever in Var and in Camargue, (in comparison with the high seroprevalence), as well as the virtual absence of reported human clinical cases. The resulting risk map appears compatible with locations of human West Nile fever cases described in the 1960s, as well as with the location of the most recently reported equine clinical cases in 2006. However, this preliminary map should be interpreted with caution, in particular because of the relatively low number of geographic cells included in our study. Hence an external validation of our model, by comparing predicted probabilities for WNV circulation status in a sample of cells with observed IgG seroprevalence, is desirable.

REFERENCES

- Akaike, H. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In: *Proceedings of the 2nd International Symposium on Inference Theory*, Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary, 1973:267–281.
- Bailey, D, Billeter, R, Aviron, S, Schweiger, O, et al. The influence of thematic resolution on metric selection for biodiversity monitoring in agricultural landscapes. *Landsc Ecol*, 2007; 22:461–473.
- Blondel, J, Isenmann, P. [Guide for the birds of Camargue]. Delachaux and Niestlé, Lausanne, Switzerland, 1981:344 p.
- Brownstein, JS, Skelly, DK, Holford, TR, Fish, D. Forest fragmentation predicts local scale heterogeneity of Lyme disease risk. *Oecologia* 2005; 146, 469–475.
- Cliff, AA, Ord, JK. *Spatial Processes: Models and Applications*. London, Plion Limited, 1981:266 p.
- Cushman, SA, McGarigal, K. Landscape-level patterns of avian diversity in the Oregon Coast Range. *Ecol Monogr* 2003; 73:259–281.
- Del Giudice, P, Schuffenecker, I, Vandebos, F, Counillon, et al. Human West Nile virus, France. *Emerg Infect Dis* 2004; 10:1885–1886.
- Dobson, A, Cattadori, I, Holt, RD, Ostfeld, RS, et al. Sacred cows and sympatric squirrels: the importance of biological diversity to human health. *PLoS Med* 2006; 3:e231.
- Dohoo, J, Martin, W, Stryhn, H. *Veterinary Epidemiologic Research*. Charlottetown, Canada, AVC Inc., 2003:706 p.
- 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.
- Durand, B, Dauphin, G, Zeller, H, Labie, J, et al. Serosurvey for West Nile virus in horses in southern France. *Vet Rec* 2005; 157:711–713.
- EEA (page consulted on Mar 07 2007). Data CLC 2000, 100 m, version 08/2005. URL: <http://dataservice.eea.europa.eu/dataservice/>
- European Commission. (page consulted on Mar 07, 2007). Agriculture: from land cover to landscape diversity in the European Union, [online]. URL: <http://www.ec.europa.eu/comm/agriculture/publi/landscape/index.htm>
- Ezenwa, VO, Godsey, MS, King, RJ, Guptill, SC. Avian diversity and West Nile virus: testing associations between biodiversity and infectious disease risk. *Proc R Soc B* 2006; 273:109–117.
- Hayes E, Komar N, Nasci R, Montgomery S, et al. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:1167–1173.
- Hoffmann, L, Mouchet, J, Rageau, J, Hannoun, C, et al. [Epidemiology of the West Nile virus: study of an outbreak in Camargue. II. Outline of the physical, biological and human environment]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 1968; 114:521–538.
- IFEN. (page consulted Mar 07th 2007). Données et indicateurs: Corine Land Cover [online]. URL: <http://www.ifen.fr/donIndic/Donnees/corine/presentation.htm>
- Jackson, LE, Hilborn, ED, Thomas, JC. Towards landscape design guidelines for reducing Lyme disease risk. *Int J Epidemiol* 2006; 35:315–322.
- Joubert, L, Oudar, J, Hannoun, C, Beytout, D, et al. Epidémiologie du virus West Nile: étude d'un foyer en Camargue. IV. La méningo-encéphalomyélite du cheval. *Ann Inst Pasteur* 1970a; 118:239–247.
- Joubert, L, Oudar, J. Les zoonoses arbovirales, leur présence en France. II. La méningo-encéphalomyélite équine West Nile du Midi méditerranéen français. *Rev Med Vet* 1970b; 121:221–245.
- Leblond, A, Sandoz, A, Lefebvre, G, Zeller, et al. Remote sensing-based identification of environmental risk factors associated with West Nile virus circulation in Camargue, France. *Prev Vet Med* 2007; 79:20–31.
- Mailles, A, Dellamonica, P, Zeller, H, Durand, JP, et al. Human and equine West Nile virus infections in France, August–September 2003. *Eurosurveillance Weekly* 2003; 7.
- McGarigal, K, Marks, BJ. FRAGSTATS: spatial pattern analysis program for quantifying landscape structure. USDA For Serv Gen Tech Rep 1995:PNW-351.
- McGarigal, K, McComb, WC. Relationships between landscape structure and breeding birds in the Oregon Coast Range. *Ecol Monogr* 1995; 65:235–260.
- Murgue, B, Murri, S, Zientara, S, Durand, B, et al. West

WEST NILE VIRUS RISK ALONG THE MEDITERRANEAN COAST

263

- Nile outbreak in horses in southern France, 2000 : the return after 35 years. *Emerg Infect Dis* 2001; 7:692–696.
- Ostfeld, RS, Keesing, F. The function of biodiversity in the ecology of vector-borne zoonotic diseases. *Can J Zool* 2000; 78:2061–2078.
- Panthier, R, Hammoun, C, Beytout, D, Mouchet, J. Epidémiologie du virus West Nile: étude d'un foyer en Camargue. III. Les maladies humaines. *Ann Inst Pasteur* 1968; 115:435–445.
- R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2006. URL: <http://www.R-project.org>
- Schindler, S, Poirazidis, K, Wrška, T. Towards a core set of landscape metrics for biodiversity assessments: a case study from Dadia National Park, Greece. *Ecol Indic* (2007), doi:10.1016/j.ecolind.2007.06.001
- Thompson, MC, Connor, SJ. Environmental information systems for the control of arthropod vectors of disease. *Med Vet Entomol* 2000; 14:227–244.
- Zeller HG, 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; 23:147–156.

Address reprint requests to:

*Sophie Pradier
Clinique équine
Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort
7 Avenue du Général de Gaulle
94700 Maisons-Alfort
France*

E-mail: spradier@vet-alfort.fr

This article has been cited by:

1. V. CHEVALIER, A. DUPRESSOIR, A. TRAN, O. M. DIOP, C. GOTTLAND, M. DIALLO, E. ETTER, M. NDIAYE, V. GROSBOIS, M. DIA, N. GAIDET, A. A. SALL, V. SOTI, M. NIANG. 2010. Environmental risk factors of West Nile virus infection of horses in the Senegal River basin. *Epidemiology and Infection* 1. [[CrossRef](#)]

C. Influence de l'eau sur la circulation du virus West Nile chez les chevaux en région Camargue

Ce troisième paragraphe fait l'objet d'une deuxième étude sur l'identification de facteurs de risque environnementaux favorables à la circulation du virus WN en France.

Il est logique de s'intéresser à l'influence de l'eau sur la circulation du virus WN, puisque cet élément va être fondamental dans le cycle de vie du vecteur de la maladie, le moustique, mais aussi constituer un milieu potentiellement favorable au réservoir, les Oiseaux. Les milieux humides sont pour les Oiseaux des lieux de reproduction, des haltes migratoires, des aires de repos et de nutrition. Les zones de circulation connues du virus WN sont pour la plupart des zones humides, mais en France une transmission a eu lieu en zone sèche, lors de l'épizootie en Camargue en 2000. Il paraît donc intéressant d'analyser plus spécifiquement cet élément naturel qu'est l'eau dans notre zone d'étude principale, la Camargue et de tenter de déterminer l'influence des milieux humides sur la circulation enzootique du virus WN.

L'objectif principal de cette étude n'était pas seulement d'analyser le lien direct existant entre l'environnement favorable à la circulation du virus WN et la séropositivité des chevaux, témoins de cette circulation, mais aussi d'identifier des facteurs de risque individuels, comme par exemple la race, l'âge et l'activité des chevaux.

Les données environnementales utilisées et issues d'images satellitales Landsat étaient de plus grande résolution spatiale (30 m) que les données d'occupation CLC (100 m) utilisées dans la première étude. Un nombre conséquent d'images a été utilisée et l'interprétation de celles-ci a été effectuée en vue de l'identification de seulement deux classes d'occupation du sol : l'eau libre (marais, étangs, lagunes, salins) et la végétation inondée (rizières, sansouires, roselières).

1. Résumé de l'article

La zone d'étude était la Camargue au sens large (Carte 3). Les données sérologiques utilisées étaient issues d'un échantillon de 135 écuries géoréférencées et visitées lors de deux enquêtes de terrain en 2007 et 2008. L'analyse sérologique des anticorps IgG dirigés contre le virus WN a été effectuée sur 1161 chevaux, dont les caractéristiques individuelles ont été enregistrées lors des enquêtes. La séroprévalence globale de l'échantillon était de 12,2 % (IC 95 % = [10,3-14,1]).

Les données environnementales ont été collectées à partir de la classification de 15 images satellitales Landsat acquises d'août 2006 à août 2008. Trois classes d'occupation du sol ont été distinguées sur ces images : eau libre, végétation inondée et autre. Pour chaque image satellitale, la surface de chacune des 3 classes d'occupation du sol a été calculée dans une zone tampon de 4 rayons différents : 2, 3, 4 et 5 km autour de chaque écurie.

Les données d'occupation du sol ont été regroupées selon 4 périodes d'acquisition des images en fonction de la présence et de l'abondance des populations de moustiques :

- Périodes avec présence de moustiques :
 - o Groupe 1 : totale (d'avril à septembre inclus)
 - o Groupe 2 : l'été seulement (juin à août inclus)
 - o Groupe 3 : en avril et septembre
- Période sans moustiques (d'octobre à mars inclus) : Groupe 4

Pour chaque groupe d'images, la moyenne (M), l'écart-type (EC) et le coefficient de variation ($CV = EC/M$) des surfaces en eau libre et végétation inondée ont été calculés.

Pour l'analyse statistique, nous avons considéré que les écuries étaient positives quand au moins un cheval était séropositif en IgG (= 61 écuries). Pour les écuries négatives (=74), nous avons voulu prendre en compte le fait que toutes les écuries n'ont pas été échantillonnées de la même façon (rapport non fixe du nombre de chevaux prélevés sur le nombre total de chevaux de l'écurie) et qu'il existait un risque de mauvaise classification des écuries négatives si le pourcentage d'échantillonnage était trop faible. Nous avons donc calculé une probabilité d'erreur de classification des écuries négatives, qui nous a permis de créer des sous-groupes d'écuries négatives avec lesquels nous avons effectué l'analyse statistique. Quatre valeurs de probabilité d'erreur ont été définies : 5, 10, 15 et 20 %.

Une analyse bivariée a été effectuée pour tester l'association entre la séropositivité des chevaux et les variables individuelles (âge, race, activité...), montrant des différences significatives pour certaines variables.

L'analyse multivariée a été conduite en deux étapes :

- sur les écuries pour identifier les variables environnementales significatives pour la circulation enzootique du virus WN.

-sur les chevaux pour identifier cette fois les variables individuelles significatives pour la circulation enzootique du virus, les facteurs environnementaux étant pris en compte.

Pour les écuries, le meilleur modèle était celui qui correspondait à une probabilité d'erreur de classification des écuries négatives de 15 %, une zone tampon de 2 km autour des écuries et le groupe 2 d'images Landsat (été). Les variables significatives étaient :

-d'une part la surface moyenne en eau libre autour des écuries et les coordonnées géographiques X et Y qui étaient négativement corrélées au risque de circulation du virus,

-d'autre part le nombre total de chevaux dans l'écurie et la surface moyenne en végétation inondée, positivement corrélées au risque.

Ce modèle avait un pourcentage global de bonne classification de 64,4 %.

Pour les chevaux, les variables significatives étaient la race, l'âge et l'activité du cheval. Etre né de race Camargue, après 2004 et utilisé dans un centre équestre sont des facteurs négativement corrélés au risque de circulation du virus WN chez les chevaux.

2. "Influence of water on the circulation of the West Nile Virus in horses in Southern France"

Cette étude fait l'objet d'un article en préparation en vue d'une soumission pour la revue *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. L'article est intégré directement au texte.

Running title: West Nile Virus circulation in horses in France

Abstract :

West Nile Virus (WNV), a mosquito-borne flavivirus primarily circulating among bird populations, can infect humans and horses, potentially causing severe, even fatal, neurological manifestations in these hosts. WNV circulation is strongly influenced by environmental conditions, in particular those influencing mosquito breeding sites. This study aimed at evaluating the link between WNV circulation in horses and the presence of water bodies around equine stables using LandSat images.

135 stables were selected and georeferenced in three French departments (Hérault, Gard, Bouches-du-Rhône) and 1161 horses were tested by serological analysis (anti-WNV IgG ELISA) in 2007 or 2008. Data about horses were collected through a questionnaire.

Fifteen Landsat images (August 2006 to August 2008) were classified into three classes: open water, flooded vegetation and other. Surface areas of the first two classes were calculated for buffers of 2 to 5 km around each stable and for each date.

Two multivariate analyses were conducted: GLMs to identify which environmental variables were involved in the circulation of WNV in stables and GRMs to identify the horse variables linked to WNV circulation after having subtracted environmental effects.

The best model distinguishing 46 negative stables (no positive horse considering an error threshold of 0.15) from 61 positive stables (at least 1 positive horse) used 2 km buffers and included mean area of flooded vegetation in summer, total number of horses present in the stable, mean area of open water in summer and X and Y geographic coordinates. The first two variables had a positive effect and the other three a negative effect. The model predicted correctly 75.4 % of positive stables and 55.4 % of negative ones. At the horse level, breed, activity and age were significantly associated to WNV infection risk. Camargue horses born after 2004 and working in riding schools appeared to be the less affected.

These results could be used to target WNV surveillance in Southern France.

Title Page

Influence of water on the circulation of West Nile Virus
in horses in Southern France

Sophie Pradier^{1,2}, Alain Sandoz^{3,4}, Gaëtan Lefebvre³, Annelise Tran⁵, Sylvie Lecollinet⁶ and Agnès Leblond^{2,7}

¹ : Clinique équine, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (ENVA), 7 Av du Général de Gaulle 94700 MAISONS-ALFORT, FRANCE (spradier@vet-alfort.fr)

² : Epidémiologie animale, UR 346 INRA Theix 63122 SAINT GENES CHAMPANELLE, FRANCE

³ : Tour du Valat, le Sambuc 13200 ARLES, FRANCE (sandoz@tourduvalat.org, lefebvre@tourduvalat.org)

⁴ : DENTES, Université de Provence 13000 MARSEILLE, FRANCE

⁵ : Maison de la télédétection, CIRAD, 34000 MONTPELLIER, FRANCE (annelise.tran@cirad.fr)

⁶ : UMR 1161 Virologie, INRA ANSES ENVA, 23 Av du Général de Gaulle 94700 MAISONS-ALFORT, FRANCE (slecollinet@vet-alfort.fr)

⁷ : Clinéquine, VetAgro Sup, Campus vétérinaire de Lyon, 1 Av Bourgelat 69200 MARCY L'ETOILE, FRANCE (a.leblond@vetagro-sup.fr)

Keywords

West Nile virus, Horse, Risk Factor, Spatial epidemiology, France.

INTRODUCTION

West Nile Virus (WNV) is a flavivirus belonging to the Japanese encephalitis virus serocomplex and is transmitted by mosquitoes, mainly of the genus *Culex*, between wild birds. This virus is the most widespread flavivirus in the world (Weissenböck et al. 2010). Having caused unprecedented human and equine outbreaks in the USA since its introduction in New York City in 1999, WNV also worries European health authorities who qualify it as a re-emergent virus. In 2008 and 2009, equine and human outbreaks have occurred in Italy and in Hungary (Barzon et al. 2009, Calistri et al. 2009, Gobbi et al. 2009, Kutasi et al. 2009, Monaco et al. 2009, Rizzo et al. 2009). In France, the

Camargue region is considered as an endemic area for WNV since the 1960's (Hoffmann et al. 1968).

Horses and humans are incidental and dead-end hosts, but show neurological disorders in approximately 10 % of infected horses and 1 % of infected humans based on epidemiological observations and horse experimental infections (Petersen et al. 2001, Bunning et al. 2002, Castillo-Olivares et al. 2004). Real prevalence rate in these species is difficult to establish because of a major proportion of unapparent infections.

Infected horses present clinical signs of encephalomyelitis: fever (not always observed : 14-62%), ataxia, paresis or paralysis of one, two or every limbs, weakness, recumbency, muscle tremors and rigidity, abnormal behaviour (somnolence to hyperexcitability), hyperesthesia, facial nerve paralysis, dysphagia and tongue paresis (Castillo-Olivares et al. 2004, Pellegrini-Masini et al. 2006). Some clinically affected horses die spontaneously or are euthanized on humane grounds, but some recover with moderate after-effects (Porter et al. 2003, Salazar et al. 2004). Mortality rates were estimated at 43 %, 28 %, 22 % and 15.6 % in Italy in 1998, in France in 2000, in France in 2004 and in Italy in 2008 respectively (Cantile et al. 2000, Murgue et al. 2001, Zeller et al. 2004, Calistri et al. 2009).

WNV epidemiological cycle is rather complex and the actors of this cycle are still unknown in most countries where the virus is present. In Europe, WNV circulation is confined to two types of cycles and ecosystems: a rural cycle between wild, usually wetland, birds and ornithophilic mosquitoes and a urban cycle between synanthropic or domestic birds and mammophilic / ornithophilic mosquitoes (Komar 2000).

In France, several epidemiological studies were undertaken on WNV considering data from three actors of the epidemiological cycle:

Partie II – Travaux personnels et résultats

- birds, virus reservoirs (Jourdain, Schuffenecker et al. 2007, Jourdain, Toussaint et al. 2007, Jourdain et al. 2008, Balanca et al. 2009)
- mosquitoes, vectors (Balenghien et al. 2008)
- horses, indicator of WNV circulation owing to their high sensitivity to the infection (Ostlund et al. 2001, Durand et al. 2005, Leblond et al. 2005, Leblond, Hendrikx et al. 2007).

Disease control benefits from a thorough understanding of its pathogenic mechanisms and risk factors. Like any vector-borne disease, WNV infection is highly influenced by environmental conditions and the presence of specific habitat factors, such as vegetation and standing water, allows for the prediction of infection foci (White 2001). Studying environmental risk factors is a prerequisite for the identification of conditions favourable to virus circulation. But one should not neglect individual factors which also influence viral transmission. Horses can be used as animal sentinels for WNV surveillance. In the Camargue, they are widely distributed and live in rural as well as urban zones. Leblond et al in 2007 have shown that it is relevant to consider the equine population as a sentinel for WNV circulation in this region (Leblond, Hendrikx et al. 2007).

Our study was designed in order to:

- determine environmental risk factors favourable to WNV circulation in stables, using remotely sensed landscape elements and Geographic Information System (GIS) technology
- analyze horse intrinsic risk factors by statistical multivariate analysis, once environmental factors taken into account.

Finally this investigation sought to develop a predictive model to account for these factors and to assess their relative importance in the establishment of the WNV pattern observed in horses in the Camargue region.

MATERIALS AND METHODS

Study area

The Camargue is the Rhone river delta region near the Mediterranean coast and the main wetland area in south-eastern France. From an ecological point of view, this region presents diversified environments in which dry areas are continuously irrigated by canals, ditches and wetlands (Hoffmann et al. 1968). These biotopes are favourable to the proliferation of mosquitoes and to the housing of resident or migratory birds. More than 300 bird species are observed in this area (Isenmann 1993) and large mosquito populations are present due to the great abundance and diversity of mosquito-breeding sites (Poncon et al. 2007).

Landscapes in the Camargue are strongly influenced by the duration of submersion periods and soil salinity (Poncon et al. 2007). Landscapes are roughly organized along a south-to-north gradient of salinity with agricultural land (vineyards in particular) and reeds in the north and natural salty ponds and marshes in the south. Rice is currently the main cultivated crop in the Camargue.

Thousands of horses, often in extensive breeding, live in this region. The last French Agricultural Census of livestock in 2000 estimated the Camargue equine population at around 7000 individuals (Leblond, Sandoz et al. 2007). Horses are not distributed homogeneously (Durand et al. 2002). In the north of the study area, land is more devoted to vineyards and agriculture than in the south, where there is a greater equine density.

Field sampling and laboratory analysis

The target population included all horses living in the Camargue, but actually meant all horses followed by veterinarians in the study area. Stables were randomly selected from a database created and maintained since the 2000 WNV outbreak (Leblond et al. 2005).

135 stables were enrolled and georeferenced by the same person in the study area presented in Figure 1 (Table 2). Two periods of sampling were conducted (May to July 2007 and April to June 2008). Individual characteristics of sampled horses (breed, age, sex, activity, date of arrival in the stable, diseases observed for 6 months) and data about stables were recorded by the same person through a questionnaire.

1161 serum samples were collected from horses and ponies. Percentage of sampling in stables varied from 7 to 100 % (Mean = 50.7 %) according to the owner availability and to the accessibility and docility of horses.

After blood collection, serum was separated by gentle centrifugation and stored at -20°C. Sera were processed and tested for anti-WNV IgG using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (ID Screen® West Nile Competition, Montpellier, France) in the Community Reference Laboratory (CRL) for Equine Diseases (ANSES, French Agency for food, environmental and occupational health safety, Maisons-Alfort, France). Due to the absence of other flaviviruses circulating in the region, ELISA-positive results were assumed to be WNV-specific.

Environmental data

15 Landsat Images corresponding to the study area and periods of interest were freely acquired from the following Internet site: Landsat 7 Archive Earth Explorer (<http://glovis.usgs.gov/> accessed 18 June, 2010). Landsat sensors measure spectral

reflectance in the visible, near infrared, mid-infrared and thermal-infrared wavelengths and cover an area of 185 km X 180 km with a 30m spatial resolution. The mid-infrared channel can be used to discriminate between open water and vegetation. Black bands bordering Landsat images were handled with a generalization process with GeoImage™ software.

Pixels of Landsat images were classified into 3 land cover classes: open water, flooded vegetation (rice fields, reeds...) and other. A supervised classification was conducted using the software GeoImage™. A set of training data with ground truth was generated. Ten training zones were selected. Half of the samples was used as a training set for the parameter estimation phase. The other half was used as a validation set, calculating a confusion matrix, in order to assess the accuracy of the classification for each land cover classes. Images were then imported into a Geographic Information System (ESRI®, ArcGIS™ 9.3).

Area of each land cover classes was calculated for buffers around stables of 4 different radiuses (2, 3, 4 and 5 km), by using the software MapInfo™.

Landsat images were split into 4 periods: presence of mosquitoes (3 groups) or not (1 group). Dates of images considered in each group are presented in Table 1.

Statistical analysis:

Every stables in which at least one horse was found WNV IgG-positive were considered as positive stables.

Negative stables were selected considering a threshold of potential misclassification as negative stables as a consequence of the various sampling percentage.

This threshold was calculated for each stable by multiplying two proportions ($P^+ * P_x$):

Partie II – Travaux personnels et résultats

- P^+ , the proportion of seropositive horses in positive stables: in our sampling, $P^+ = 22.7\%$ (number of positive horses (=142) divided by the total number of tested horses in positive stables (=625)).

- P_x , the proportion of non tested horses in each stable ($P_x = 1 -$ proportion of tested horses in each stable).

Statistical analysis was conducted with the Statistica™ software (<http://www.statsoft.fr/>, 2010).

A bivariate Chi-Square analysis was performed to assess the relationship between WN seropositivity and horse variables. Differences were considered statistically significant at alpha risk ≤ 0.05 .

Then a multivariate analysis using logistic regression was conducted in two steps.

At the stable level, the probability of a stable to be at risk for WNV infection was calculated. At this level, only environmental risk factors were considered. Generalized linear models (GLZ) with a binomial distribution and a logit link function were used. This link function is well adapted to dichotomic field data. Model selection was based on Akaike Information Criteria (AIC) minimisation (Akaike 1973).

Explanatory variables included in the GLZ models were total number of horses in the stable, geographical coordinates X and Y, mean areas of open water and flooded vegetation and their coefficients of variation (CV= ratio of the standard deviation to the mean).

These models were assessed for different buffer radius (2, 3, 4 and 5 km), threshold of misclassification of negative stables (5, 10, 15 and 20 %) and each group of images (Table 1).

For each model, an AIC and a percentage of stable good classification were calculated and the best model was selected.

Once the GLZ model had been chosen, the difference between the probability of a stable to be at risk for WNV infection and seropositivity of each horse in this stable was calculated. This calculation aimed at explaining residual differences through the identification of individual risk factors. General regression model (GRM) was used. The dependant variable consisted of residues (r) calculated by the following formula:

$$r = \text{WNV seropositivity of horse} - \text{predicted value of the best model at stable level} + 0.5.$$

Explanatory variables were breed, age, sex, activity, date of acquisition, disease occurrence up to 6 months before the study.

RESULTS

Serological results:

The overall prevalence rate was 12.2 % in our sampling (n = 1161, 95 % Confidence Interval 10.3 to 14.1%). The mean number of seropositive horses was 1.05 horse per stable (standard error = 0.164, minimum = 0, maximum = 12).

74 stables were found negative. Threshold of misclassification of 5, 10, 15 and 20 % selected respectively 16, 29, 46 and 72 negative stables.

Every positive stables (n = 61; 45 %) were included for further analysis (625 horses).

Figure 1 shows spatial distribution of seronegative and seropositive stables in the study area.

Bivariate analysis:

Several horse variables were significantly associated with WNV seropositivity (Chi-Square test) (Table 3). Prevalence rate was significantly higher in Camargue horses than in other breeds ($p < 0.0001$) and in geldings than in other categories ($p = 0.0001$). In groups of horses born since 2004 ($p < 0.0001$), acquired since 2004 ($p < 0.0001$) and used in riding schools ($p < 0.0001$), prevalence rates were significantly lower than in every other groups. Disease occurrence up to 6 months before the study had no significant effect on WNV status ($p = 0.25$).

Multivariate analysis:

Stable level:

The best model in terms of AIC and percentage of stable classification corresponded to a buffer radius of 2 km, a misclassification threshold of 15 % (46 negative stables, 312 horses) and Landsat images in summer (Table 1). Selected variables in the best model were total number of horses in the stable, geographical coordinates X and Y, mean area of flooded vegetation in summer and mean area of open water in summer (AIC= 118, $p < 0.0001$).

Detailed results of this model are presented in Table 4.

Total number of horses in the stable and mean area of flooded vegetation in summer were positively associated with positive stables, while mean area of open water in summer was negatively associated.

This model had a global percentage of good classification of 64.4 %. 55.4 % of all the negative stables and 75.4 % of the positive stables were correctly classified.

Horse level:

Detailed results of the logistic regression at horse level are presented in Table 5 and in Figures 2 to 4.

Horse variables which had a significantly positive effect on WNV seropositivity were a birth date prior to 1987 and horse activity dedicated to livestock cutting.

On the contrary, birth date after 2004, Camargue breed and main activity in riding schools had a significantly negative effect on WNV seropositivity.

DISCUSSION

We found an overall WNV seroprevalence rate of 12.2 % which is an intermediate figure in comparison with previous serological surveys carried out in this region. In 1963-64, a serosurvey was conducted in the same zone and 6 of 37 horses (16.2 %) were found positive for WNV (Joubert et al. 1970). In 2000 during the equine WNV outbreak, equine seroprevalence rate was estimated around 8.5 % (Durand et al. 2002). In 2003 in the Var region (150 km east to the present study area) after confirmation of equine and human WNV clinical cases, IgG seroprevalence rate was much greater (34 %) (Durand et al. 2005). However comparisons with these serosurveys are hindered by differences in epidemiological situations at those times (epidemic context; studies were conducted within a radius of 10 to 30 km of equine clinical cases, only one month after the first report of cases). In such a context, seroprevalence rate mainly depends on the definition of the serosurvey perimeter (Durand et al. 2002).

The main goal of this study was to determine the best statistical model to predict WNV circulation in horses in the Camargue. To achieve this objective, a consistent sample of equine sera was collected in 2 years. To reach a power of 80 %, an alpha risk of 5 %, a

precision of 2 % and a seroprevalence around 12 %, around 1030 horses had to be sampled: our study enrolled more than 1100 horses. This sampling seemed representative of the equine population in this French region. The Camargue breed is clearly dominant in the region, as in our sample (54.6 %). Livestock cutting horses are also very specific to this region and this activity is well represented in our sample too. Getting a better insight into the size and the geographic distribution of the equine population in the study area should allow for a more precise assessment of the sample representativeness.

The percentage of stable good classification obtained through the proposed model was of more than 60 %. This result appears quite satisfactory for field biological data. Moreover this percentage was more than 75 % for the good classification of positive stables.

Several radiuses of buffers (2 to 5 km) around the stables have been tested on the basis of the disease biology and of maximum distance of horse regular movements, for livestock cutting for example. In Camargue, potential vectors of WNV are mosquito species of the genera *Aedes* and/or *Culex*. *Aedes* adults travel long distances from their breeding places, 10-20 km being rather common, whereas *Culex* mosquitoes seem to have a maximum flight distance of 5 km (Pratt et al. 1993). The radius selected in the best model was 2 km. This small radius size could indicate that mosquito species of the genus *Culex* participate in WNV transmission to horses, which is in agreement with current entomological hypothesis (*Culex modestus* and/or *C. pipiens* are suspected to be the main WNV vectors in France) and with the study conducted in Camargue in 2004 (Leblond, Sandoz et al. 2007) : two rather small clusters of equine WNV cases were

identified in the wet area of Camargue, the first one had a radius of 4 km and the second 9 km.

The group of Landsat images leading to the best model was the summer one (June to August). This result can be interpreted in the light of knowledge on WNV epidemiological cycle. In France, environmental conditions in summer are the most favourable for the WNV cycle to operate at full speed. Birds are gathering around and on water plans and mosquito densities are at their maximum. In late summer, accidental hosts like horses can then become infected and manifest clinical signs, typically in September.

Analysis of environmental risk factors based on remote-sensing data and GIS is widely used in epidemiology (Moore et al. 1999, Thompson et al. 2000, Reisen 2010). A logical sequence linking measures of radiation from a sensor on a satellite to vector or host presence and disease occurrence is proposed (Crombie et al. 1999, Ward 2009). Several studies dealing with the identification of environmental risk factors for WNV circulation in horses have thus been published in the USA, Guadeloupe and Africa (Epp et al. 2007, Mongoh et al. 2007, Pradel et al. 2009, Rios et al. 2009, Ward 2009, Ward et al. 2009, Chevalier et al. 2010).

Vector-borne disease occurrence results from complex interactions which make the interpretation of risk factors models somewhat difficult (Pradel et al. 2009). Risk factors may indicate the presence of reservoirs, hosts and/or vectors. Identifying risk factors may provide insight into the epidemiological cycle of WNV, even if the vector or reservoir species have not yet been identified (Pradel et al. 2009).

The risk factors in our model can be widely commented. According to our model, the more the total number of horses present in a stable, the more the stable would be at risk

of WNV infection. This result simply illustrates that with more exposed individuals, WNV infection risk increases and becomes more easily identifiable and is a classical finding in veterinary epidemiology: assuming all animals in a given group are exposed to the same low-level probability of infection, the more animals in the group, the higher the probability that one (or more) of them become infected (Durand et al. 2002). This result concurs with what was reported earlier in the same region during the 2000 equine outbreak (Durand et al. 2002).

Our study identified mean areas of open water and flooded vegetation around the stables during the summer as environmental factors significantly associated with WNV circulation in horses in the Camargue. These two variables had respectively a negative effect and a positive effect on the risk of viral circulation. According to our results, environment at risk for WNV transmission corresponded the flooded vegetation such as rice fields or reed beds. These results could be compared with knowledge on preferred biotopes for the suspected WNV vectors (Pratt et al. 1993). Preferential larval habitats of *Culex modestus* are semi-permanent wet areas, for example rice fields, reeds or high and wet “sansouire” (*Arthrocnemum fruticosum*) (mean <2 g/L of salt) (Rioux 1958, Hoffmann et al. 1968), which corresponds to our landscape class “flooded vegetation”. *C. pipiens* oviposit preferentially in urban zones, in particular in flooded cellars, cisterns, ponds and septic tanks (Hoffmann et al. 1968). *Aedes* larval habitats are constituted by brackish temporary ponds and low “sansouire” (*Arthrocnemum glaucum*) in Camargue (mean of 10 g/L of salt) (Hoffmann et al. 1968). In France WNV was only isolated from *Culex modestus* in 1964 and 1965 (Hannoun et al. 1964, Panthier et al. 1966). Nowadays neither entomological studies nor sequentially collected samples have highlighted any other infected mosquito species. But the recent outbreak in 2000 in dry

zones of the Camargue outside of the *C. modestus* distribution region suggested the existence of other WNV vectors.

C. modestus, the most abundant bird-feeders in the wetlands of the Camargue (Balenghien et al. 2006), was shown to efficiently transmit WNV by biting (Balenghien et al. 2007) and exhibited high dissemination and transmission rates after experimental exposure to WNV (Balenghien et al. 2008). As a consequence, *C. modestus* can be considered an important natural WNV vector and is most probably involved in very efficient rural cycles between wetland birds in breeding or resting sites where mosquitoes and birds are abundant, like reeds. In such sites, as this species also feeds aggressively on humans and horses (Mouchet et al. 1970, Balenghien et al. 2006), it could serve as both a maintenance and a bridge vector (Balenghien et al. 2008).

C. pipiens, the most abundant bird-feeders in dry areas of the Camargue (Balenghien et al. 2006), was found naturally infected with WNV in Europe (Hubalek et al. 1998, Esteves et al. 2005) and is able to transmit WNV by biting (Tiawsirisup et al. 2005). But Balenghien et al in 2008 considered this species as a moderately competent vector (Balenghien et al. 2008). They postulated that this species could be involved as the main epidemic vector in dry areas (between birds and horses) and the secondary vector in wetlands.

Aedes caspius, the most abundant mammophilic species in the whole Camargue (Balenghien et al. 2006), feeds aggressively on humans and horses and is able to engorge also on birds, but this species can be considered as a poorly competent WNV vector (Balenghien et al. 2008). Its role as WNV bridge vector in the Camargue seems to remain anecdotal.

Our results, that would suggest that *Culex* species are involved in WNV transmission in the Camargue, are in agreement with the study from Leblond et al. (Leblond, Sandoz et al. 2007), in which *Culex* spp. appeared to be the main epizootic vector involved in WNV transmission cycle in wet zones of the Camargue during the 2004 outbreak.

In our study, mean area of open water had a negative effect on the risk of viral circulation, which is in contradiction to results of a similar study in the same area (Leblond, Sandoz et al. 2007). In this previous study, rice fields and wet “sansouire” were negatively associated with infection sites, whereas woodlands, dry bushes and open water were positively associated. However comparison with this study is difficult because of two major reasons:

- differences in data sets: clinical cases during a WNV outbreak in the study of Leblond et al *versus* serological data during a period of apparent inactivity of WNV in our study,
- spatial restriction of the study area to the wet zone of the Camargue in the study of Leblond et al 2007 *versus* a larger study area including the dry zone of the Camargue in our study.

In another study in 2002 in North Dakota, USA, the proposed model showed that permanent water bodies were not a significant environmental factor associated with WNV occurrence in horses (Mongoh et al. 2007). Authors postulated that smaller temporary and seasonal water bodies created during warmer months by melting snow or heavy rainfalls did play a significant role as a breeding ground for mosquitoes, but not perennial water bodies.

In a study on environmental risk factors for equine WNV cases in Texas during the period of 2002 to 2004, Ward et al developed a predictive model which highlighted the importance of the vicinity of the Brazos River watershed and lakes (Ward et al. 2009).

Authors postulated that these factors were associated with the presence of wild birds or of large mosquito populations around standing water. Presence of swamps was not associated with occurrence of equine WNV cases.

Two basic assumptions, that all observations are independent and identically distributed, underlie this type of statistical analysis. However, this is rarely true for spatial data, where observations that are close have a higher probability of being similar than observations far apart, a phenomenon called spatial autocorrelation. This phenomenon can result in model misspecification, such as identifying significant predictors that might be associated with the outcome simply because of their spatial pattern (Ward et al. 2009). In this study, geographic coordinates X and Y were found to be significant in the model, which allowed to take the spatial autocorrelation into account and confirmed that the spatial position of stables is a significant risk factor for this vector-borne disease.

Results of the logistic regression at horse level were also very interesting and original. The study of Leblond et al in 2005, conducted in the same region, did not identify any equine individual data like breed, age, sex and activity as WNV risk factor (Leblond et al. 2005). Once risk factors related to the stables had been taken into account, we could make out risk factors intrinsic to the horse. Horses born before 1987 were more likely to be seropositive for WNV if they were housed in a stable at risk. This finding can be explained by the fact that these old horses were exposed to many WNV circulation events. We do not know much about WNV circulation between the 1960's and the outbreak in 2000. According to the literature, WNV would have remained "silent" and would not have caused detectable disease in horses and humans during this period. The virus could have circulated among horses born before 1987 without severe clinical

manifestations. The Camargue is now considered as an endemic region for WNV and it would be logical to observe an increase of seroprevalence with age. This finding didn't concur with what was reported earlier (Durand et al. 2002). Authors postulated that an endemic transmission cycle would be geographically restricted to marshes where half-wild horses live and were not sampled in the serosurvey of 2000.

Livestock cutting horses housed in stables at risk had more risks to be seropositive than horses used in riding schools. These results can be explained by an increased exposure to mosquitoes in cutting horses housed in natural pastures frequently humid, while horses of riding schools are housed in inside buildings and work in environments where mosquito control measures are applied.

A protective factor related to the horse in stables at risk was the fact of being born after 2004, the year of the latest WNV outbreak identified in the Camargue. Since 2004, no WNV confirmed clinical case has been reported in this region. Obviously WNV circulation has become undetectable since 2004 by the existing monitoring systems (network of sentinel veterinarians and passive surveillance of birds) and our results confirmed this observation.

Another protective factor for horses is to belong to the Camargue breed. Our assumptions to explain this result are:

- a genetic adaptation of the breed toward this endemic virus,
- the fact that Camargue horses are gray-coated and that it has been proven that gray-coated horses are less frequently bitten by mosquitoes than dark-coated horses.

This result of the multivariate analysis is in contradiction with the results of the bivariate analysis and a study in 2000 in the same region (Durand et al. 2002). By integrating every equine variables at the same time in the model, after having taken into

account the effects of the variables related to the environment, it appeared that the breed Camargue significantly reduced the risk that the horse was found seropositive, when it was in a stable at risk.

This study provides interesting results on WNV environmental and horse risk factors and opens several prospects. Thanks to the statistical model established, a risk map will be realized on all the study area, which could help increasing the sensitivity of the WNV passive monitoring. External validation using independent data should also be performed. Moreover, this risk map could be superimposed on distribution maps of several species of mosquitoes and birds potentially acting in the WNV transmission cycle. Potential vaccination campaigns could be targeted on equine populations at higher risk of WNV infection. Identifying vector species in the Camargue is also important for the implementation of control measures.

Acknowledgments

This work was conducted thanks to the availability and active participation of horse owners and veterinarians in Camargue. Without them nothing would have been possible. We thank also the “Haras Nationaux” for their financial support.

Author Disclosure Statement:

No competing financial interests exist.

References

- Akaike, H (1973). Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In : Proceedings of the 2nd International Symposium on Inference Theory, Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary.
- Balanca, G, Gaidet, N, Savini, G, Vollot, B et al. Low West Nile virus circulation in wild birds in an area of recurring outbreaks in Southern France. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2009; 9:737-741.
- Balenghien, T, Fouque, F, Sabatier, P and Bicout, DJ. Horse-, bird-, and human-seeking behavior and seasonal abundance of mosquitoes in a West Nile virus focus of southern France. *J Med Entomol* 2006; 43:936-946.
- Balenghien, T, Vazeille, M, Grandadam, M, Schaffner, F et al. Vector competence of some French Culex and Aedes mosquitoes for West Nile virus. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2008; 8:589-595.
- Balenghien, T, Vazeille, M, Reiter, P, Schaffner, F et al. Evidence of laboratory vector competence of Culex modestus for West Nile virus. *J Am Mosq Control Assoc* 2007; 23:233-236.
- Barzon, L, Squarzon, L, Cattai, M, Franchin, E et al. West Nile virus infection in Veneto region, Italy, 2008-2009. *Euro Surveill* 2009; 14.
- Bunning, ML, Bowen, RA, Cropp, CB, Sullivan, KG et al. Experimental infection of horses with West Nile virus. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:380-386.
- Calistri, P, Giovannini, A, Savini, G, Monaco, F et al. West Nile Virus Transmission in 2008 in North-Eastern Italy. *Zoonoses Public Health* 2009.
- Cantile, C, Di Guardo, G, Eleni, C and Arispici, M. Clinical and neuropathological features of West Nile virus equine encephalomyelitis in Italy. *Equine Vet J* 2000; 32:31-35.
- Castillo-Olivares, J and Wood, J. West Nile virus infection of horses. *Vet Res* 2004; 35:467-483.
- Chevalier, V, Dupressoir, A, Tran, A, Diop, OM et al. Environmental risk factors of West Nile virus infection of horses in the Senegal River basin. *Epidemiol Infect* 2010; 138:1-9.
- Crombie, MK, Gillo, RR and Arvidson, RE. An application of remotely derived climatological fields for risk assessment of vector-borne disease: a spatial study of filariasis prevalence in the Nile delta, Egypt. *Photogramm Eng Rem Sens* 1999; 65:1401-1409.
- 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.
- Durand, B, Dauphin, G, Zeller, H, Labie, J et al. Serosurvey for West Nile virus in horses in southern France. *Vet Rec* 2005; 157:711-713.
- Epp, T, Waldner, C, Leighton, FA, Berke, O et al. Seroprevalence and risk factors for infection with West Nile virus in Saskatchewan horses, 2003. *Can J Vet Res* 2007; 71:256-263.
- Esteves, A, Almeida, AP, Galao, RP, Parreira, R et al. West Nile virus in Southern Portugal, 2004. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2005; 5:410-413.

- Gobbi, F, Napoletano, G, Piovesan, C, Russo, F et al. Where is West Nile fever? Lessons learnt from recent human cases in northern Italy. *Euro Surveill* 2009; 14.
- Hannoun, C, Panthier, R, Mouchet, J and Eouzan, JP. [Isolation in France of the West Nile Virus from Patients and from the Vector *Culex Modestus Ficalbi*]. *C R Hebd Seances Acad Sci* 1964; 259:4170-4172.
- Hoffmann, L, Mouchet, J, Rageau, J, Hannoun, C et al. [Epidemiology of the West Nile virus: study of an outbreak in Camargue. II. Outline of the physical, biological and human environment]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 1968; 114:521-538.
- Hubalek, Z, Halouzka, J, Juricova, Z and Sebesta, O. First isolation of mosquito-borne West Nile virus in the Czech Republic. *Acta Virol* 1998; 42:119-120.
- Isenmann, P. [*Oiseaux de Camargue*]. *The birds of Camargue*. Brunoy: Société d'Etudes Ornithologiques ed.; 1993:158 p.
- Joubert, L, Oudar, J, Hannoun, C, Beytout, D et al. [Epidemiology of the West Nile virus: study of a focus in Camargue. IV. Meningo-encephalomyelitis of the horse]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 1970; 118:239-247.
- Jourdain, E, Schuffenecker, I, Korimbocus, J, Reynard, S et al. West Nile virus in wild resident birds, Southern France, 2004. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2007; 7:448-452.
- 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; 7:15-33.
- Jourdain, E, Zeller, HG, Sabatier, P, Murri, S et al. Prevalence of West Nile virus neutralizing antibodies in wild birds from the Camargue area, southern France. *J Wildl Dis* 2008; 44:766-771.
- Komar, N. West Nile viral encephalitis. *Rev Sci Tech* 2000; 19:166-176.
- Kutasi, O, Biksi, I, Bakonyi, T, Ferenczi, E et al. Equine encephalomyelitis outbreak caused by a genetic lineage 2 West Nile virus in Hungary. *Proceedings from AAEP annual Convention* 2009; 55:179.
- Leblond, A, Hendriks, P and Sabatier, P. West Nile virus outbreak detection using syndromic monitoring in horses. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2007; 7:403-410.
- Leblond, A, Sandoz, A, Lefebvre, G, Zeller, H et al. Remote sensing based identification of environmental risk factors associated with West Nile disease in horses in Camargue, France. *Prev Vet Med* 2007; 79:20-31.
- Leblond, A, Zientara, S, Chadoeuf, J, Comby, N et al. Prévalence de l'infection par le virus West Nile chez le cheval en Camargue en 2001. *Rev Med Vet* 2005; 156:77-84.
- Monaco, F, Lelli, R, Teodori, L, Pinoni, C et al. Re-Emergence of West Nile Virus in Italy. *Zoonoses Public Health* 2009.
- Mongoh, MN, Khaita, ML and Dyer, NW. Environmental and ecological determinants of West Nile virus occurrence in horses in North Dakota, 2002. *Epidemiol Infect* 2007; 135:57-66.
- Moore, DA and Carpenter, TE. Spatial Analytical Methods and Geographic Information Systems: Use in Health research and Epidemiology. *Epidemiol Rev* 1999; 21:143-161.

- Mouchet, J, Rageau, J, Laumond, C, Hannoun, C et al. [Epidemiology of West Nile virus: study of a focus in Camargue. V. The vector: *Culex modestus* Ficalbi Diptera; Culicidae]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 1970; 118:839-855.
- 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.
- Ostlund, EN, Crom, RL, Pedersen, DD, Johnson, DJ et al. Equine West Nile encephalitis, United States. *Emerg Infect Dis* 2001; 7:665-669.
- Panthier, R, Hannoun, C, Oudar, J, Beytout, D et al. [Isolation of West Nile virus in a Camargue horse with encephalomyelitis]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 1966; 262:1308-1310.
- Pellegrini-Masini, A and Livesey, LC. Meningitis and encephalomyelitis in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2006; 22:553-589, x.
- Petersen, LR and Roehrig, JT. West Nile virus: a reemerging global pathogen. *Emerg Infect Dis* 2001; 7:611-614.
- Poncon, N, Balenghien, T, Toty, C, Baptiste Ferre, J et al. Effects of local anthropogenic changes on potential malaria vector *Anopheles hyrcanus* and West Nile virus vector *Culex modestus*, Camargue, France. *Emerg Infect Dis* 2007; 13:1810-1815.
- Porter, MB, Long, MT, Getman, LM, Giguere, S et al. West Nile virus encephalomyelitis in horses: 46 cases (2001). *J Am Vet Med Assoc* 2003; 222:1241-1247.
- Pradel, J, Chalvet Monfray, K, Molia, S, Vachiery, N et al. Risk factors for West Nile virus seropositivity of equids in Guadeloupe. *Prev Vet Med* 2009; 92:71-78.
- Pratt, HD and Moore, GC. *Mosquitoes of Public Health Importance and their control*. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services ed.; 1993.
- Reisen, WK. Landscape epidemiology of vector-borne diseases. *Annu Rev Entomol* 2010; 55:461-483.
- Rios, LM, Sheu, JJ, Day, JF, Maruniak, JE et al. Environmental risk factors associated with West Nile virus clinical disease in Florida horses. *Med Vet Entomol* 2009; 23:357-366.
- Rioux, JA. [*Les culicidés du Midi méditerranéen*]. Paris: Paul Lechevalier ed.; 1958:302 p.
- Rizzo, C, Vescio, F, Declich, S, Finarelli, AC et al. West Nile virus transmission with human cases in Italy, August - September 2009. *Euro Surveill* 2009; 14.
- Salazar, P, Traub-Dargatz, JL, Morley, PS, Wilmot, DD et al. Outcome of equids with clinical signs of West Nile virus infection and factors associated with death. *J Am Vet Med Assoc* 2004; 225:267-274.
- Thompson, MC and Connor, SJ. Environmental information systems for the control of arthropod vectors of disease. *Med Vet Entomol* 2000; 14:227-244.
- Tiawsirisup, S, Platt, KB, Evans, RB and 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.
- Ward, MP. Equine West Nile virus disease occurrence and the Normalized Difference Vegetation Index. *Prev Vet Med* 2009; 88:205-212.
- Ward, MP, Wittich, CA, Fosgate, G and Srinivasan, R. Environmental risk factors for equine West Nile virus disease cases in Texas. *Vet Res Commun* 2009; 33:461-471.

- Weissenböck, H, Hubalek, Z, Bakonyi, T and Nowotny, N. Zoonotic mosquito-borne flaviviruses: worldwide presence of agents with proven pathogenicity and potential candidates of future emerging diseases. *Vet Microbiol* 2010; 140:271-280.
- White, DJ. Vector surveillance for West Nile virus. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 951:74-83.
- Zeller, HG and 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; 23:147-156.

TABLES

Table 1: Grouping of Landsat Images

Groups	Dates of images	
Presence of mosquitoes	Group 1= Total period	<p>2006 : August 20th</p> <p>2007 : April 17th September 8th September 24th</p> <p>2008 : June 22nd July 8th August 9th</p>
	Group 2 = Summer	<p>2006 : August 20th</p> <p>2008 : June 22nd July 8th August 9th</p>
	Group 3 = Other	<p>2007 : April 17th September 8th September 24th</p>
No mosquito		<p>2006 : December 10th December 26th</p> <p>2007 : January 11th January 27th March 16th December 13th</p> <p>2008 : February 15th March 2nd</p>

Table 2: Description of stables

Variables	Mean	Standard deviation	Minimum	Maximum
Total number of equids	25.4	1.9	2	132
Number of tested horses	8.6	0.5	1	58

Table 3: Description of horse samples

Variables		N (Percentages)	Prevalence rates in % [95 % Confidence Intervals]
Breed	Camargue	634 (54.6)	9.0 [7.4-10.7]
	Iberic	122 (10.5)	0.4 [0.1-0.8]
	Other	405 (34.9)	2.8 [1.8-3.7]
	(poneys, saddle horses...)		
Born	Before 1987	69 (5.9)	1.9 [1.1-2.7]
	1987-1999	660 (56.8)	8.0 [6.4-9.6]
	2000-2003	251 (21.6)	1.9 [1.1-2.7]
	Since 2004	158 (13.6)	0.4 [0.1-0.8]
	Missing	23 (2.1)	
Sex	Gelding	675 (58.1)	9.0 [7.3-10.6]
	Mare	351 (30.2)	2.8 [1.9-3.8]
	Stallion	133 (11.5)	0.4 [0.1-0.8]
	Missing	2 (0.2)	
Activity	Riding school	224 (19.3)	0.8 [0.3-1.3]
	Livestock cutting	271 (23.3)	4.3[3.1-5.5]
	Retired	54 (4.7)	1.3 [0.6-1.9]
	Others	609 (52.5)	5.9[4.5-7.2]
	Missing	3 (0.2)	
Date of acquisition	Before 1987	28 (2.4)	0.9 [0.3-1.4]
	1987-1999	356 (30.7)	6.1 [4.7-7.5]
	2000-2003	311 (26.8)	3.1 [2.1-4.1]
	Since 2004	429 (37.0)	2.0 [1.2-2.9]
	Missing	37 (3.1)	
Diseases (<6 months)	No	1057 (91.0)	11.6 [9.7-13.4]
	Yes	94 (8.1)	0.7 [0.2-1.2]
	Missing	10 (0.9)	

Table 4: Results of logistic regression **at stable level**

Variables of selected model	Estimates	p-values
Total number of horses	0.071	0.002204
Geographic coordinate X	-4.118	0.003642
Geographic coordinate Y	-7.384	0.063589
Mean area of open water in summer	-0.005	0.059474
Mean area of flooded vegetation in summer	0.007	0.003241
Intercept	338.98	0.051986

Table 5: Results of logistic regression **at horse level**

Variables	p-values	Estimates (p-value)
Breed : Camargue Iberic Other	0.014800	-0.059 (p=0.004)
Age : Before 1987 1987-1999 2000-2003 Since 2004	0.001239	0.179 (p=0.005) -0.152 (p=0.0001)
Sex : Mare Gelding Stallion	0.804571	
Activity : Retired Livestock cutting Riding schools Other	0.000017	0.066 (p=0.03) -0.144 (p<0.0001)
Date of acquisition Before 1987 1987-1999 2000-2003 Since 2004	0.378199	
Diseases for 6 months : Yes No	0.756789	
Intercept	0.140701	

FIGURES

Figure 1:

Localisation of stables in the study zone (classification of a Landsat image of September 8th 2007)

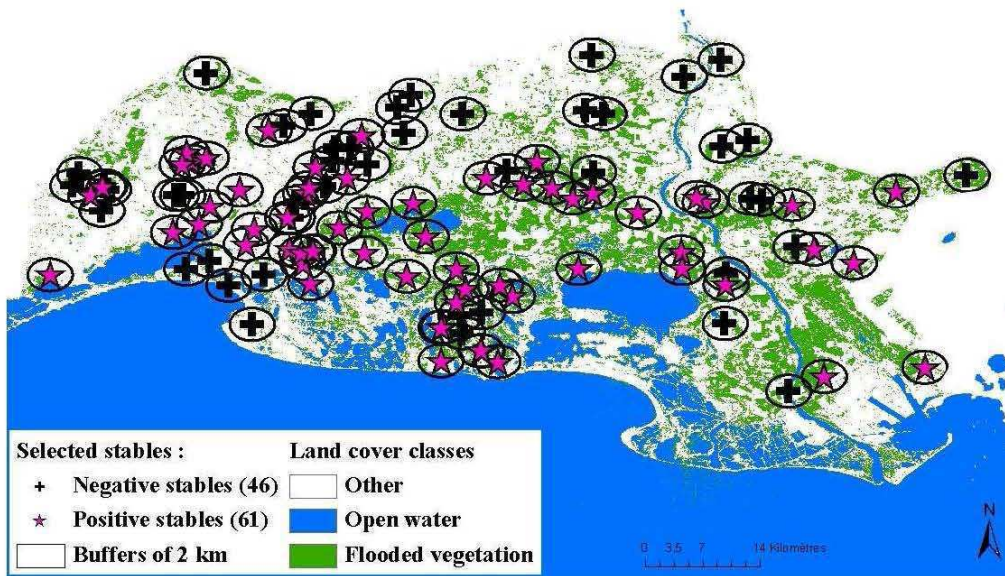


Figure 2: Results of logistic regression at horse level: **Variable Breed**

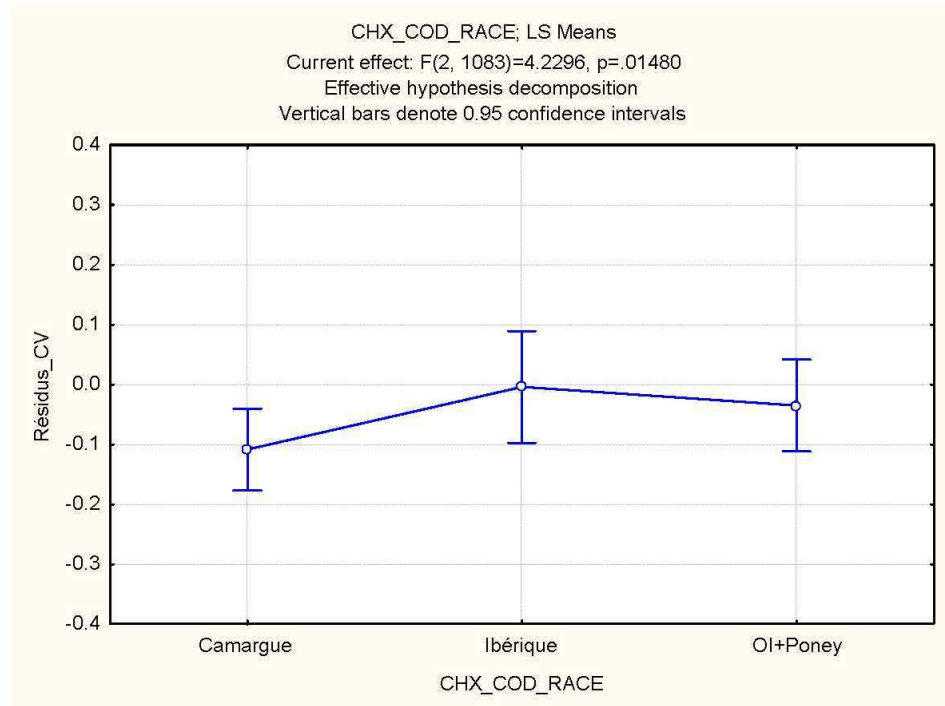


Figure 3: Results of logistic regression at horse level: **Variable Age**

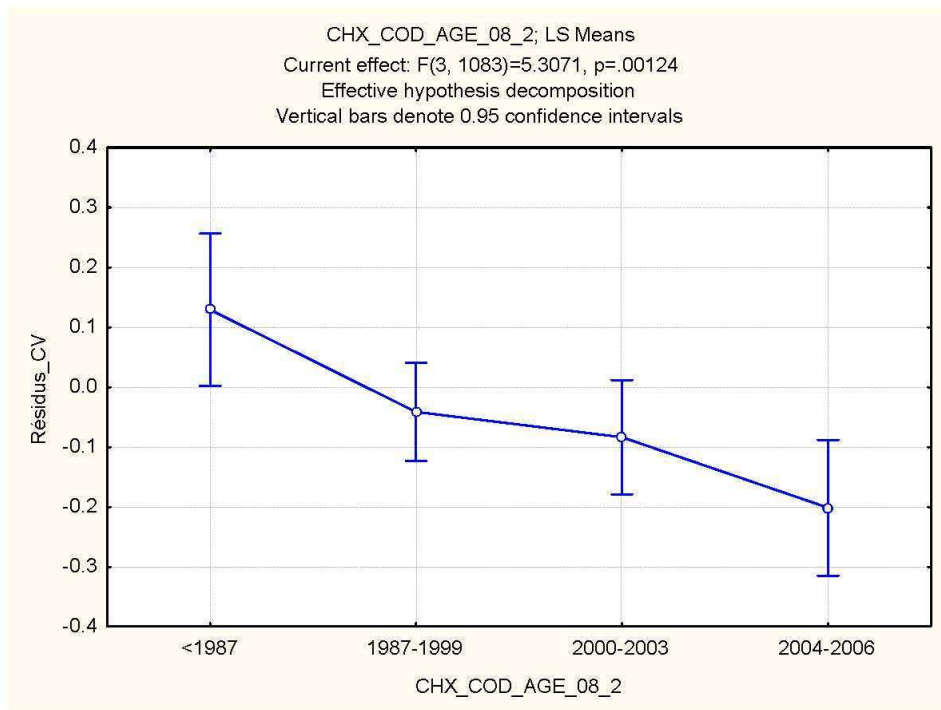
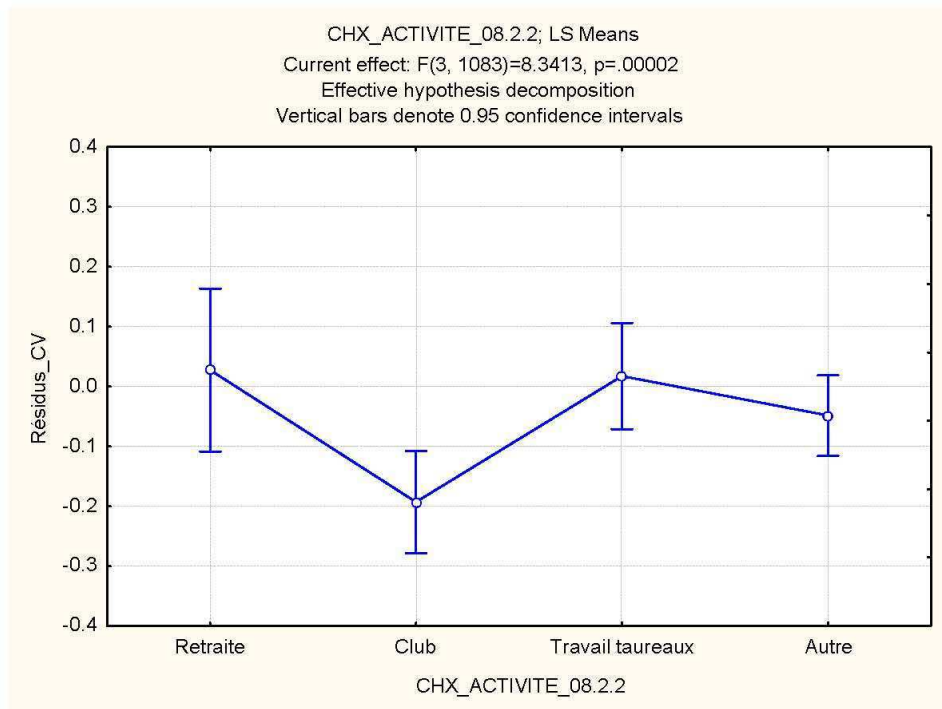


Figure 4: Results of logistic regression at horse level: **Variable Activity**



D. Etude des mécanismes de transmission du virus West Nile en région Camargue

Ce paragraphe fait l'objet d'une troisième étude dont l'approche est différente des deux précédentes.

Comme nous l'avons vu dans la première partie de ce document, étant donné le grand nombre d'espèces hôtes et vecteurs potentiellement impliquées dans la transmission du virus WN, l'épidémiologie d'une telle maladie infectieuse multi-hôtes est très complexe.

Pour tenter de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans les cycles épidémiologiques du virus WN, la démarche classique, utilisée dans les deux premiers articles, était plutôt d'observer les « patterns » ou patrons de circulation du virus, puis de formuler des hypothèses de mécanismes de transmission en fonction des facteurs de risque environnementaux identifiés. Dans cette étude, la démarche est inversée. En effet, la méthode utilisée est de construire des patrons de distribution sous forme de cartes de risque dans une région donnée, ici la Camargue, à l'aide d'un SIG et à partir de différentes combinaisons d'hypothèses de mécanismes de transmission (appelées scénarios). Puis ces patrons sont comparés à ceux observés grâce à la récolte de données sérologiques chez les hôtes principaux, les Oiseaux, mais aussi accidentels, les Chevaux.

Notre étude en Camargue s'intéressera au fait que les processus d'introduction, d'amplification et d'émergence du virus WN sont liés à l'existence d'associations spécifiques entre certaines espèces de Moustiques vecteurs et d'hôtes Oiseaux, dans le temps et dans l'espace. Le paysage est considéré comme un révélateur de ces associations spécifiques d'hôtes et de vecteurs, puisque ces hôtes et vecteurs sont eux-mêmes associés à des unités écologiques spécifiques.

Comme plusieurs études aux Etats-Unis ont établi une corrélation négative entre la diversité aviaire et l'incidence de la maladie de West Nile, traduisant l'existence d'un « effet de dilution » (Ezenwa et al. 2006, Swaddle et al. 2008), nous avons voulu étudier cet effet en Camargue. Cet effet existe quand la présence d'un nombre important d'espèces aviaires non compétentes pour le virus WN entraîne une diminution du taux d'infection dans la population de moustiques vecteurs.

Il est important de préciser que le terme d'émergence est utilisé dans cette étude pour désigner la phase de transmission du virus aux hôtes accidentels, que sont le cheval et l'homme. Cette transmission est révélée par des résultats sérologiques positifs et peut aboutir

dans certains cas à l'apparition de cas cliniques chez ces hôtes sensibles. Dans cet article pour étudier la phase d'émergence, nous nous sommes seulement intéressés à la transmission du virus au cheval, en utilisant des données sérologiques (IgG).

Basée sur des cartes de distribution saisonnières des populations de Moustiques et d'Oiseaux issues de bases de données créées à dire d'expert et à partir de données de terrain (Tran et al. 2007), cette étude avait pour objectif principal de simuler des scénarios d'introduction, d'amplification et d'émergence du virus WN, puis de les comparer et valider en les confrontant aux données de prévalence connues chez les Oiseaux et les Chevaux.

1. Résumé de l'article

Distributions spatio-temporelles des Moustiques et des Oiseaux

Une carte d'occupation du sol de la région Camargue a été obtenue à partir d'une image satellitale Landsat de 2001. Vingt-sept classes d'occupation du sol ont été distinguées, correspondant à des unités écologiques pertinentes pour caractériser les distributions des espèces de moustiques et d'oiseaux potentiellement impliquées dans le cycle du virus WN, à dire d'expert et selon les connaissances bibliographiques (Tran et al. 2007).

Une base de données Moustiques a été créée, concernant seulement les deux espèces principalement impliquées dans le cycle du virus WN en région Camargue, d'après les connaissances actuelles : *Culex modestus* et *Culex pipiens*. L'abondance de ces deux espèces codée en 5 niveaux (0 = absent à 4 = densité très élevée) a été évaluée pour les 27 classes d'occupation du sol de la carte précédemment citée, en fonction de deux types d'activité du moustique (ponte et recherche d'hôtes) et des 4 saisons. Puis grâce à un SIG (ArcGIS®), huit cartes de distribution des moustiques (1 par espèce et par saison) ont été construites en prenant en compte la courte distance de vol de ces espèces autour des gîtes larvaires. Ces cartes ont été validées par plusieurs campagnes de piégeages dans la zone d'étude.

Une base de données Oiseaux a également été créée, en regroupant des informations sur 180 espèces sélectionnées pour leur potentielle implication dans le cycle du virus WN en Camargue, à dire d'experts et grâce aux connaissances actuelles (Jourdain et al. 2007c). L'abondance des 180 espèces d'oiseaux a été codée en 3 niveaux (de 0 à 2) en fonction des 4 saisons et des 27 classes d'occupation du sol de la carte précédemment citée. Ces données d'abondance ont été validées par des observations de terrain dans la zone d'étude. Un indice

de réservoir (« *Reservoir Index* ») codé en 4 niveaux a également été attribué à chaque espèce d'oiseaux. Cet indice a été établi d'après les données bibliographiques sur l'exposition de l'espèce au virus, sa réceptivité et sa compétence. Cet indice synthétique qualifie la capacité d'une espèce aviaire à être un réservoir pour le virus WN, selon les données bibliographiques disponibles. Enfin à chaque espèce, a été attribuée une origine de migration en fonction de la saison (Afrique du Nord, Afrique de l'Ouest, Europe de l'Est et du Nord...), une altitude maximale où l'espèce est encore présente et un potentiel de diffusion (distances de vol par saison), d'après les connaissances acquises antérieurement sur ces espèces (Jourdain et al. 2007a).

Définition des zones d'introduction potentielles du virus WN

Deux hypothèses d'introduction du virus WN ont été testées :

- 1) Une introduction par les oiseaux migrateurs à partir de l'Afrique sub-saharienne et du Maghreb au printemps ou à partir de l'Europe de l'Est et du Nord en été.
- 2) Une survie du virus pendant l'hiver chez les moustiques, soit seulement chez *C. modestus*, soit seulement chez *C. pipiens*, soit chez les deux. La survie chez les Oiseaux n'a pas été testée.

Cette phase aboutissait à 5 cartes d'introduction potentielle du virus WN : 2 par les migrateurs, 3 pour la survie pendant l'hiver chez les moustiques.

Définition des zones d'amplification potentielles du virus WN

Les hypothèses d'amplification ont conduit à élaborer des cartes correspondant aux intersections de distribution des moustiques et des oiseaux, pendant l'été.

Trois possibilités ont été testées pour l'amplification par les Moustiques : seulement par *C. modestus*, seulement par *C. pipiens* ou par les deux espèces.

Trois possibilités ont également été testées pour les Oiseaux :

- 1) Une amplification seulement par les Moineaux et les Corvidés (seules espèces dans lesquelles le virus a été isolé en Camargue).
- 2) Un potentiel d'amplification égal à l'indice de réservoir attribué dans la base de données Oiseaux à chaque espèce.
- 3) Un potentiel d'amplification identique pour toutes les espèces.

L'effet de dilution a également été testé selon 2 hypothèses : pas d'effet de dilution, un effet de dilution croissant en fonction du nombre d'espèces non-compétentes.

Enfin la diffusion par les oiseaux a également été simulée grâce aux distances de vol en fonction de l'espèce et de la saison, informations intégrées dans la base de données Oiseaux.

Définition des zones d'émergence potentielles du virus WN

Trois hypothèses ont été testées : seul *C. modestus* ou seul *C. pipiens* ou les deux espèces transmettent le virus au cheval. Les cartes correspondantes montraient les zones où au moins une des deux espèces est présente en été avec une abondance supérieure à 2.

« Scénarios » d'introduction, d'amplification et d'émergence

Un « scénario » est une combinaison d'hypothèses des trois étapes successives de transmission précédemment décrites. Une carte a été créée pour chaque hypothèse testée, puis les différentes cartes ont été enchaînées par multiplication en fonction des scénarios sur le SIG et un indice de risque (aviaire et équin) a été calculé en chaque point de la carte. Toutes les cartes créées ont été validées par les experts.

Comparaison et validation des scénarios grâce aux données sérologiques collectées chez les Oiseaux et les Chevaux :

Les différents scénarios d'introduction-amplification ont été comparés statistiquement grâce aux données sérologiques collectées sur des pies sauvages dans la zone d'étude de 2004 à 2007 (Jourdain et al. 2008, Balanca et al. 2009). Plus précisément, l'analyse statistique a consisté en la construction d'un modèle de régression pour chaque scénario. La variable à expliquer était la séroprévalence des pies et la variable explicative, l'indice de risque aviaire calculé en chaque point des cartes correspondant aux différents scénarios. Le critère d'information d'Akaike (AIC) a été utilisé pour comparer les modèles et notamment la différence entre l'AIC d'un modèle et le plus faible AIC ($\Delta_{AIC} \leq 2$) et la somme des AIC pondérés et normalisés (W_{AIC}), pour déterminer quel scénario était le plus probable.

Puis les différents scénarios d'introduction-amplification-émergence ont également été comparés statistiquement grâce aux données sérologiques équines collectées en 2007 et 2008 dans la zone d'étude par mes soins. Un modèle de régression linéaire généralisée a été construit pour chaque scénario, avec comme variable à expliquer le résultat sérologique WN de chaque cheval (positif ou négatif en IgG) et comme variable explicative l'âge du cheval et

l'indice de risque équin calculé en chaque point des cartes de scénarios d'introduction-amplification-émergence. L'AIC a été utilisé de la même manière que pour les Oiseaux.

Résultats :

Les scénarios d'introduction-amplification aboutissaient bien à des cartes de risque très différentes et les indices de risque calculés étaient tous positivement corrélés à la séroprévalence des pies, donc tous plausibles. Un nombre restreint de scénarios était statistiquement significatif, permettant de considérer certaines hypothèses comme mineures dans la transmission du virus WN en Camargue.

Le meilleur scénario d'introduction-amplification correspondait à une introduction du virus par les oiseaux migrateurs venant d'Europe du Nord ou de l'Est en été. Ce « scénario » expliquait correctement les patrons de transmission observés dans la zone d'étude, contrairement aux scénarios de survie du virus pendant l'hiver chez les moustiques. Ce résultat est en accord avec une récente étude sur la circulation du virus entre l'Europe et l'Afrique par les Oiseaux (Durand et al. 2010). Dans ce même scénario, *Culex modestus* était identifié comme le vecteur principal d'amplification du virus, en accord avec les résultats récents de Balenghien en Camargue (Balenghien 2006, Balenghien et al. 2006, Balenghien et al. 2007, Balenghien et al. 2008). Bien que les moineaux et les pies soient les deux seules espèces d'oiseaux chez lesquelles le virus a été isolé dans la zone d'étude (Jourdain et al. 2007b), les résultats suggèrent que d'autres espèces, voire toutes les espèces d'oiseaux présentes en Camargue, peuvent être compétentes et contribuer à l'amplification du virus. Enfin, l'effet de dilution n'existerait pas en Camargue lors de l'amplification du virus WN, contrairement aux USA (Ezenwa et al. 2006, Kilpatrick et al. 2006, Swaddle et al. 2008, Allan et al. 2009).

Le meilleur scénario d'introduction-amplification-émergence correspondait à une introduction du virus par les oiseaux migrateurs, mais cette fois-ci venant de l'Afrique subsaharienne et du Maghreb au printemps, une amplification par *C. modestus* seulement, plusieurs espèces d'oiseaux compétentes pour être réservoir, pas d'effet de dilution et enfin une transmission au cheval par les deux espèces de *Culex* : *C. modestus* et *C. pipiens*.

Cette étude permet de réaliser concrètement combien une maladie infectieuse multi-hôte, comme la maladie de WN, est difficile à étudier, car à chaque étape du cycle et dans chaque zone géographique où le virus circule, de nombreuses possibilités de transmission existent. Par cette méthode d'analyse, il est possible de tester toutes les combinaisons imaginables

d'hypothèses de mécanismes de transmission. Cette approche globale permet également de rassembler de très nombreuses données de sources et de format très différents et de coupler la puissance de multiples outils. C'est la première étude intégrative, écologique et sur le paysage, portant sur le virus WN en France. Elle devrait contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes de transmission du virus WN en France, en permettant de rejeter certaines hypothèses émises jusqu'alors, au minimum dans le contexte de la zone d'étude, comme la survie du virus chez les moustiques pendant l'hiver et de renforcer certaines convictions, comme l'introduction du virus par les oiseaux migrateurs.

La production de cartes de risque validées par les patrons de séroprévalence observés devrait constituer un outil précieux pour les autorités sanitaires qui continuent à surveiller la maladie de WN en France.

2. "Assessment of transmission processes of West Nile virus in Southern France using an ecological and landscape approach"

Cette étude fait l'objet d'une publication en préparation. Cet article est intégré directement au texte.

Title

Assessment of transmission processes of West Nile virus in Southern France using an ecological and landscape approach

Authors

Annelise Tran^{1,2}, Grégory L'Ambert³, Gilles Balança¹, Sophie Pradier⁴, Vladimir Grosbois¹, Eric Etter¹, Thomas Balenghien¹, Thierry Baldet¹, Agnès Leblond⁶, Didier Fontenille⁵, Paul Reiter⁷, Nicolas Gaidet¹

Affiliations

1. CIRAD, UPR AGIRs, Montpellier, France
2. CIRAD, UMR TETIS, Montpellier, France
3. Entente interdépartementale pour la démoustication (EID) Méditerranée, Montpellier, France
4. Clinique équine, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France
5. IRD, UR16, Montpellier, France
6. UR 346, Unité d'épidémiologie animale, INRA Theix, Saint Genès-Champanelle, France
7. Institut Pasteur, Paris, France

Partie II – Travaux personnels et résultats

Abstract

West Nile (WN) Fever is an emerging vector-borne disease affecting most of the countries in the world. Due to the great number of host and vector species potentially involved in the transmission processes, the epidemiology of such multi-host disease is complex.

We propose an ecological and landscape approach to assess the transmission processes likely to explain the patterns of WN virus circulation in the Camargue region, Southern France. Mosquito and bird populations were mapped for each season using expert-based knowledge and geographic information systems. We then simulated risk maps corresponding to different hypotheses of introduction, amplification and emergence of WNV and compared them with data of seroprevalence in horses and bird populations.

Results show that some of the combinations of the different steps (introduction / amplification / emergence) do explain the observed patterns of WN virus transmission in the study area, whereas some hypotheses may be rejected in the Camargue context. This work highlights the potential of modelling host and vector communities and their interactions to study multi-host diseases.

Keywords

West Nile virus, zoonotic disease, landscape, Geographic Information System, multi-host system

Introduction

West Nile virus (WNV), member of the *Flavivirus* genus (family *Flaviviridae*), is responsible for West Nile fever (WNF), an emerging arbovirolosis originating from the Old World and recently introduced to North America. In its natural cycle, the WNV is transmitted from birds to birds by *Culicidae* mosquitoes, predominantly of the *Culex* genus (Hubalek & Halouzka 1999; Campbell 2002). Wild birds are the principal hosts of WNV and the virus has been isolated from a great number of avian species in Europe (Hubalek 2000a). WNV is pathogenic for horses and humans who are considered as incidental dead-end hosts. WNV virus circulation has been confirmed at erratic intervals in the last decades in several countries of the Mediterranean basin (e.g. Abdelhaq 1996; Autorino 2002; Savini 2009) and in Eastern and Central Europe (e.g. Hubalek & Halouzka 1999; Platonov 2001). In France, several outbreaks occurred near the Mediterranean coast in the delta of the river Rhône in 1962-63 affecting horses and humans (Joubert 1970), and in 2000 and 2004 in horses (Murgue 2001; Zeller & Schuffenecker 2004).

Due to the high numbers of host and vector species potentially involved in the transmission processes, the epidemiology of such multi-host disease is complex and the mechanisms of transmission of the virus between hosts and vectors remain poorly understood (Dauphin 2004). Indeed, the vector or reservoir status and epidemiological importance of many mosquito and bird species are unknown (Campbell 2002). Serosurveys conducted in Europe show low prevalences in resident and migratory wild birds (e.g. Hubalek 2008; Lopez 2008; Balança 2009). These data suggest that WNV circulates at low level in several European places but that the transmission cycle amplifies only when some ecological conditions are met and outbreaks only occasionally occur. Nevertheless, little is known of the influence of the environment and climatic conditions on WNV transmission in Europe. WNV circulation has been often recorded in wetlands (Tsai 1998; Hubalek 1999; Hubalek 2000b; Lvov 2000; Durand 2002) but also in urban (Savage 1999) or in dry areas (Durand 2005). Moreover, it is unknown if overwintering of WNV in mosquitoes (Nasci 2001; Farajollahi 2005) or introduction by migratory birds (Rappole & Hubalek 2003; Jourdain 2007b) is responsible for outbreaks in European countries, where WNV transmission stops in winter period. Higher prevalences in some trans-Saharan migratory birds in Southern Spain suggest a potential role of these species in introduction (Lopez 2008) although till now no proof of their involvement has been brought. Finally, little is known on how the composition of the bird community impacts the transmission of WNV in Europe. Negative correlations between avian diversity and incidence in West Nile infections were recently found in the United States (Ezenwa 2006; Swaddle & Calos 2008; Allan 2009; Loss 2009), observing the 'dilution effect' (Ostfeld & Keesing 2000; Keesing 2006). This phenomenon occurs when an increase in the abundance of poorly competent hosts causes a decrease in the infection prevalence in the vector population. As far as we know, until now there is no evidence of this effect in the Old World.

Several studies have identified environmental features as risk factors for WNV infection, highlighting significant statistical relationships between environmental variables such as land use / land cover, climate, elevation, and epidemiological data of either human cases (Cooke 2006; Ruiz 2007; Brown 2008; Liu 2009), equine cases (Ward 2005; Leblond 2007; Mongoh 2007; Pradier 2008; Pradel 2009; Ward 2009; Chevalier 2010), infected birds (Gibbs 2006) or infected mosquitoes (Ezenwa

Partie II – Travaux personnels et résultats

2007; Ozdenerol 2008). Based on those relationships, risk maps of WNV circulation are constructed; nevertheless, the underlying mechanisms driving the correlations remain often unknown (Ezenwa 2007). On the other hand, several process-based models have been developed to address various aspects of WNV disease transmission, such as the impact of possible control methods (Thomas & Urena 2001; Wonham 2004; Bowman 2005), the importance of bird-to-bird transmission (Naowarat & Tang 2004; Hartemink 2007), the effect of additional avian mortality (Lord & Day 2001), the role of migratory bird in the spread of WNV (Liu 2006; Rappole 2006; Durand 2010), or of the spatial clustering of birds and mosquitoes (Shaman 2007). Recently, Bouden et al. (2008) developed a multi-agent model to offer a decision support system simulating the spread of WNV in Canada. Few of those models are spatially explicit (Liu 2006; Rappole 2006; Bouden 2008) neither adapted to represent the host-vector contact at a local scale in a real landform (Shaman 2007). As far as we know, no model was adapted to European countries where WNV outbreaks only occur at erratic time intervals.

In this paper, we propose a new integrative framework to explore the possible role of different mosquito and bird species as well as the impact of community composition to the different steps of introduction, amplification and emergence of WNV in Southern France. Indeed, in the case of a multi-host disease like WNV, the high diversity of hosts and vectors potentially involved in the transmission processes leads to a wide range of associations between hosts and vectors in space and time. The Camargue region in particular presents a high diversity and abundance of wild birds. Our hypothesis is that some of these associations in space and time are favourable to the occurrence of WNV. To characterize the spatial and temporal distribution of potential vector/host contacts, vector and bird communities were mapped for each season using expert-based knowledge and geographic information systems (GIS). Then, we used GIS modelling functionalities to simulate the potential areas of circulation of WNV according to different hypotheses of introduction, amplification and emergence of the virus. The relative risk maps were compared to data from studies on the seroprevalence in horses and bird populations to assess whether one or several combinations of introduction, amplification and emergence processes could explain the observed WNV circulation patterns in the Camargue area.

Material and methods

Study area

Our study area was the Camargue region, including the Rhône River delta, in Southern France (Figure 1). This area is bordered by Mediterranean Sea in the South and covers about 70 x 40 km between 43.33° and 43.73° north and 4.05° and 4.93° east. In this Mediterranean region, the climate is characterized by warm, dry summers and mild, wet winters. Total annual rainfall usually ranges between 500 and 700 mm and occurs mainly in autumn, and the annual mean temperature is 14°C. The landscape is composed of wet areas, including coastal lagoons, marshes, rice fields, and dry areas (agricultural zones, Mediterranean scrubland, forests). It is mainly determined by the submersion duration and the salinity of the soils.

The numerous water pools, marshes and rice fields are favourable to *Culex* mosquito population development (Balenghien 2008). Moreover, this large wetland area shelters a large variety of resident birds, and is a major route for birds migrating to and from South (Africa) and East (Europe and Asia) (Isenmann 1993).

Database building

Ecological units, relevant for characterizing the distribution of both mosquito and bird species, were defined collectively by entomologists and ornithologists, based on bibliography and expert knowledge. Remote sensing images were used to map those ecological units, resulting in an habitat map including 27 classes from five main ecotypes: maritime areas (sea, beaches and herbaceous dunes, dune forest, lagoons, salted bare soil, salt marsh vegetation, salt works), natural coastal areas (clear water, floating aquatic vegetation, mud flat, reed beds, marshes with scirpus and rushes, rush wetland temporarily flooded, rush prairies never flooded), natural continental areas (forest, scrubland, riparian forest), agricultural areas (dry herbaceous areas, vineyard, fruit trees, rice fields, cereals, fallow land, bare soil, hedges) and urban areas. The image processing method is described in detail elsewhere (Tran 2007).

Description of the spatio-temporal distribution of *Culex* mosquitoes.

The variability in space and time within the study area was described by expert knowledge for the two most abundant ornithophilic species in the Camargue area: *Culex modestus*, Ficalbi 1889, and *Culex pipiens*, Linnaeus 1758, which were demonstrated as the two WNV vectors in this area (Balenghien 2006; Balenghien 2007; Balenghien 2008). For both species, the abundance was evaluated in each land cover type (ecological unit) according to five classes of abundance (0: absent; 1: very low densities; 2: low densities; 3: high densities; 4: very high densities) for each season (spring, summer, fall and winter) and the two main female activities (breeding and host-seeking) by bibliographic review (Rioux & Arnold 1955; Rioux 1958; Service 1969; Mouchet 1970; Savage 1999; Vinogradova 2000; Medlock 2005; Balenghien 2006) and opinions of entomologist experts. Then, GIS functionalities were used to map the distribution of mosquitoes for each season, taking into account their short dispersal distance around their breeding sites. The resulting maps were validated through mosquito collections (Method and Results presented in Supplementary Material).

Description of the spatio-temporal distribution of the bird community.

A database describing the seasonal variability in the bird species diversity, abundance and habitat selection over the study area has been built. First, out of >350 bird species that have been recorded in Camargue (Isenmann 1993), 180 species were selected, excluding relatively rare or vagrant species. Second, abundance of every bird species has been evaluated from literature data and our own knowledge, according to three abundance categories (uncommon, frequent, common) in every 27 habitats and every four seasons. Third, this bird database has been evaluated through field observations (See Supplementary Material).

A specific reservoir index has been given to every bird species ranging from 1 (species likely to be of low epidemiological importance in WNV transmission) to 4 (species of very high importance in WNV transmission), taking into account its

Partie II – Travaux personnels et résultats

exposition to the WN virus (4 classes based on seroprevalence data), its receptivity (2 classes based on (Komar 2003), isolation and inoculation experiments data), and its competence (2 classes based on Komar's reservoir class index given for some species and high viremia data).

Additional information on the origin of migrating birds was included in the database. Indeed, migrating birds coming from areas where WNV is endemic or epidemic can introduce the virus in the area during migration, either in spring for migrating birds coming from the African continent, or in summer for migrating species coming from Eastern Europe where some migrating birds were tested seropositive for WNV (Hubalek 2008). Finally, for all bird species, a spread distance range (<0.5 km, <1 km, <10 km, <50 km, > 50 km) was estimated by bibliography (Cramp & Simmons 1977; 1979; 1982) and expert knowledge and included in the database.

The whole database is available upon request.

Analysis process

Definition of WNV 'introduction areas'.

Because competent mosquitoes are not active during winter in the Camargue, we considered that WNV vectorial transmission stops during winter time. Thus, we defined as 'introduction areas' the areas where the virus starts circulating for the first time in the year, either in areas where the virus is introduced by infected migratory birds (hypothesis I₁) or where overwintering infected mosquito females become active again after diapause (hypothesis I₂) (Figure 2).

For hypothesis I₁, WNV could be introduced from migratory birds arriving in the Camargue region either in spring - originating from sub-saharan or Maghreb areas (I_{1a}) or in summer - originating from Eastern or Northern Europe (I_{1b}) (Jourdain 2007b). To map such introduction areas, the number of migrating birds coming from Africa or from Europe was extracted from the bird database for each ecological unit in spring and summer, respectively. Then, a level of risk of introduction ranging from 0 to 3 was attributed to each habitat according to the number of migratory species present (classification using the standard-deviation method). For the second hypothesis (I₂), different mosquito species could be involved: either *Culex modestus* (I_{2a}) or *Culex pipiens* (I_{2b}) or both species (I_{2c}) (Balenghien 2008). The areas of introduction in spring were defined as the areas where mosquito population is not rare (class of abundance higher than 2) before the period of diapause in autumn.

Definition of possible WNV 'amplification areas'.

Virus amplification occurs when a bird-to-bird transmission cycle takes place, the virus being transmitted by mosquitoes. Thus, 'amplification' areas are located where competent host and vector populations intersect (Figure 3), and the level of amplification was defined according to the abundance of vector and host populations and to the composition of the bird community (Figure 2).

We considered that amplification occurs in summer and mapped the 'amplification areas' performing the following steps:

- 1) Different mosquito species could be competent for WNV amplification: either *Culex modestus* (hypothesis A_{1xxx}) or *Culex pipiens* (A_{2xx}) or both species (A_{3xx}) (Balenghien 2008). A level of risk of amplification by the vector

population ranging from 0 to 3 was attributed to each habitat according to the abundance of either one (level of risk equal to 0 when the species is absent or present at very low densities and equal to 1, 2 or 3 when the species is present at low, high or very high densities, respectively) or both mosquito species (Table 1).

- 2) Birds may have a different reservoir status for WNV amplification. House sparrows (*Passer domesticus*) and black-billed magpies (*Pica pica*) are the only two bird species in which the virus was isolated in the Camargue region (Jourdain 2007a) and thus could be considered as the only competent hosts in the area (hypothesis A_{x1x}). On the other hand, every bird species could be involved in the WNV transmission cycle, either with different competence, according to the reservoir index (hypothesis A_{x2x}), or all with the same competence (hypothesis A_{x3x}). For each hypothesis, a level of risk for host amplification was calculated to each habitat as the weighted sum of the species present in the habitat, with the following weights: 1 for sparrows and magpies and 0 for all other species (A_{x1x}); the value of the reservoir index defined in the bird database (A_{x2x}); 1 for every species (A_{x3x}). Then, this level of risk of host amplification was recoded, ranging from 0 to 3 (classification using the standard-deviation method).
- 3) A level of vector-host amplification was defined for each habitat by multiplying the vector amplification risk by the host amplification risk, and then recoded between 0 and 3.
- 4) The composition of the bird community may impact the amplification of WNV by creating a ‘dilution effect’, when an increase in the abundance of poorly competent hosts causes a decrease in the infection prevalence in the vector population. We therefore considered two hypotheses: firstly, the bird community composition does not impact the virus amplification (hypothesis A_{xxx1} : no ‘dilution effect’); second, an increase of the number of non-competent host causes a decrease of the virus amplification (hypothesis A_{xxx2}). In this second case, a level of risk (0 to 3) was attributed to each habitat decreasing when the number of non-competent species increases and multiplied to the level of vector-host amplification.

Definition of possible WNV ‘emergence areas’.

Here we defined the ‘emergence’ as the transmission of WNV from mosquito to sensitive hosts, but not necessarily the development of clinical symptoms. The ‘emergence areas’ are defined as the areas with the mosquito species likely to bite WNV sensitive hosts, *ie* horses or humans, and transmit them the virus. Both *Culex modestus* and *Culex pipiens* are likely to act as bridge vectors between birds and mammals, so we considered three hypotheses of emergence. Either *Culex modestus* is responsible for transmission of WNV to equine population (E_1) or *Culex pipiens* (E_2) or both species (E_3). Thus, the ‘emergence areas’ were defined as the areas where each or both species are present in summer (with class of abundance higher than 2).

Scenarios of introduction, amplification and emergence of WNV.

The combination of the different steps of introduction, amplification and emergence composes a ‘scenario’ of WNV transmission. In a first step, the areas at risk of introduction (I) are intersected with the areas favourable to WNV amplification (A) (Figure 4a). The level of resulting risk is obtained by the multiplication of the risk of introduction and the risk of amplification. From those areas of introduction followed by virus amplification, birds involved in the amplification

Partie II – Travaux personnels et résultats

process can spread the virus outside of the amplification areas (Figure 4b). The spread distance of each bird species in summer was used to map the areas of WNV circulation in avian populations, characterized by an **avian risk index** decreasing with the distance to the areas of virus introduction/amplification. This avian risk index corresponds to a ‘scenario’ of WNV transmission in the bird community, noted $I_{iA_{jkl}}$, with $i=\{1a, 1b, 2a, 2b, 2c\}$ and j, k, l in $\{1, 2, 3\}$.

In turn, the obtained areas of a given introduction-amplification-spread scenario are intersected with the areas favourable to WNV emergence (E) (Figure 4c). An **equine risk index** was calculated by multiplying the avian risk index by the risk of emergence. Each resulting scenario, noted $I_{iA_{jkl}E_m}$, with $i=\{1a, 1b, 2a, 2b, 2c\}$, j, k, m , in $\{1, 2, 3\}$ and l in $\{1,2\}$, corresponds to a risk map of WNV emergence in sensitive hosts. We used GIS functionalities to model all the possible scenarios and create the corresponding maps (ArcGIS Modeler) (Figure 5).

Assessment of the different maps.

We used seroprevalence data from avian and equine populations to assess the different maps of amplification in the avian population (avian risk index) and emergence (equine risk index) and compare the different scenarios.

Comparison of the amplification maps with seroprevalence data from avian populations.

Data from two different serological surveys on black-billed magpies between 2004 and 2007 were used to characterize the spatial variability of seroprevalence of WNV in birds in the Camargue area. They include 15 sites where more than 10 individuals were sampled and tested for WNV (Jourdain 2007a; Balança 2009).

For each scenario, a regression model was built with the seroprevalence as the response and the avian risk index as explanatory variable. We assumed an over-dispersed Poisson distribution of the data and thus used a negative binomial distribution. The Akaike’s Information Criterion (AIC) was used to compare the models corresponding to the different scenarios (Akaike 1974). Models were ranked according to Δ_{AIC} , the difference of AIC values of a given model and the model having the lowest AIC. Then, we calculated the normalized Akaike weights (w_{AIC}) which can be interpreted as the probability of a model to be a ‘good model’ (Burnham & Anderson 2004). To compare different groups of models, we summed the w_{AIC} (Σw_{AIC}) of the scenarios corresponding to each hypothesis of introduction, vector amplification, host amplification and diversity effect. A hypothesis is more likely to be true if it has the higher Σw_{AIC} .

Comparison of the emergence maps with seroprevalence data from equine populations.

Data from an extensive serological survey on horses from 2007 to 2008 (Pradier, in press) were used to characterize the areas of WNV emergence, *ie* WNV circulation in equine populations. A total of 1161 horses originating from 135 stables were included in the analysis. The age of all horses was recorded, ranging from 1 to 42 years. Indeed, age can have a significant positive effect on WNV prevalence (Chevalier 2010). For each scenario, we used a generalized linear mixed model, with the individual serological status as the binomial response and the age and the equine risk index as fixed effects. As previously, AIC and w_{AIC} were calculated to assess the different models and compare groups of scenarios corresponding to the different hypothesis of introduction, vector amplification, host amplification, diversity effect and emergence.

Results

Maps of WNV amplification in the avian population.

The combination of different hypotheses of introduction, vector and host amplification and diversity effect led to a total of 75 different maps of amplification in the avian population (avian risk index). Results showed heterogeneous spatial patterns between the scenarios outputs (Examples Figure 6), highlighting that the combination of the different hypotheses considered led to very different risk maps of WNV circulation in avian populations. In the regression models, all avian risk indices resulting from the different scenarios of introduction and amplification were positively correlated with seroprevalence data collected from magpies' populations in the Camargue area. The best model according to AIC was that where WNV is introduced by migrating birds from Eastern or Northern Europe, amplified by *Culex modestus* populations and all birds species, without any dilution effect ($I_{1b}A_{131}$) (Table 2 and Figure 6a).

Of the 75 candidate models, 3 models can be considered having substantial support ($\Delta_{AIC} \leq 2$), 3 having slightly less support ($2 < \Delta_{AIC} \leq 4$), 25 having considerably less support ($4 < \Delta_{AIC} \leq 7$) and 44 having no support ($\Delta_{AIC} > 7$).

Comparing the families of scenarios by summing the w_{AIC} (Table 4) showed that the hypothesis of introduction of the virus by migratory birds has a much higher probability of being the « right » model than the hypothesis of virus overwintering. This suggested that scenarios of introduction of the virus by migratory birds explained well observed spatial patterns of WNV transmission in the study area, whereas the hypothesis of overwintering of WNV in mosquitoes did not. The mosquito species *Culex modestus* was identified as the main amplifier of WNV. On the other hand, results suggested that magpies and sparrows are not the only competent reservoir of WNV in the Camargue area but that other competent bird species - or all bird species - contribute to WNV amplification. Finally, the composition of the bird community did not seem to play a major role in the amplification of WNV in the Camargue region (no 'dilution effect').

Maps of WNV emergence in the equine population.

The combination of the 31 plausible maps of amplification in the avian population ($\Delta_{AIC} \leq 7$) with areas favourable to WNV emergence led to a total of 93 different maps of emergence in the equine population (equine risk index).

In the regression models, the individual serological status was positively correlated with the age and the equine risk index. Of the 93 candidate models, one can be unambiguously selected as the best model ($\Delta_{AIC} \leq 2$, $w_{AIC} > 0.5$), three can be considered having slightly less support ($2 < \Delta_{AIC} \leq 4$), two having considerably less support ($4 < \Delta_{AIC} \leq 7$) and 87 having no support ($\Delta_{AIC} > 7$) (Table 3). The best model resulted from a combination of a virus introduction by migratory birds from Sub-saharan Africa or Maghreb, the virus amplification by *Culex modestus*, some competent bird species and without dilution effect, and a virus emergence due to both *Culex modestus* and *Culex pipiens* ($I_{1b}A_{121}E_3$).

Comparing the families of scenarios by summing the w_{AIC} supported all the conclusions of the confrontation of avian risk maps with seroprevalence data in magpies (Table 4). In addition, results suggested that both vector species, *Culex modestus* and *Culex pipiens*, are involved in the process of transmission of WNV to equine populations.

Discussion

In this paper, we proposed an integrative approach to study WNV transmission in an area where the virus circulates at very low level (Balança 2009) and outbreaks only occasionally occur (Joubert 1970; Murgue 2001; Zeller & Schuffenecker 2004). Based on a landscape map and a seasonal time step, maps of vector and host populations were used to simulate WNV transmission according to different scenarios of introduction, amplification and emergence of the virus. This allowed, for the first time, to explore the underlying mechanisms driving the observed spatial heterogeneity of WNV seroprevalence in birds and horses. Indeed, the comparison of the maps of WNV amplification in the avian population and the maps of WNV emergence in the equine population derived from different scenarios with seroprevalence data of birds and horses, respectively, draws to the same conclusions about the hypotheses on the different steps of introduction, amplification and emergence of WNV in the Camargue area.

The results showed that there is not one unique scenario (combination of the different steps of introduction, amplification and emergence) explaining all the spatial heterogeneity of WNV seroprevalence in the area; different scenarios explain well the observed seroprevalence patterns. Nevertheless, according to our analysis, some hypotheses alone do not fit with the observed WNV patterns. Even if the existence of the corresponding mechanisms could not be ruled out, our results highlighted that such mechanisms are not predominant in WNV transmission in the Camargue.

Comparing the families of scenarios by summing the w_{AIC} showed that the hypothesis of introduction of the virus by migratory birds received substantial support from the data (Table 3). Instead, the hypothesis of virus overwintering did not explain the spatial heterogeneity of WNV circulation in the Camargue area. This result is in concordance with a recent study proposing a metapopulation model for WNV circulation between Europe and Africa, demonstrating that overwintering mechanisms are not needed to reproduce the observed data of seroprevalence rates in migratory and resident wild birds, minimal infection rates in vectors and seroprevalence and incidence rates in horses (Durand 2010).

According to our analysis, the mosquito species *Culex modestus* was identified as the main amplifier of WNV. This result corroborates the results of laboratory competence studies (Balenghien 2007; Balenghien 2008). In these studies, *Culex modestus* was found an extremely efficient laboratory WNV vector and could thus be considered the main WNV vector in wetlands of the Camargue.

Concerning the host populations, our results highlighted that sparrows and magpies are not the only two bird species involved in WNV amplification, although they are the only species in which the virus was isolated in the Camargue region (Jourdain 2007a). Since sparrows and magpies are abundant species, inhabit most habitats and are often considered as good reservoirs of WNV, recent studies have focussed on them but other species, particularly passerines such as Carrion crow (*Corvus corone*) or finches (*fringillidae*), may have played a role as reservoirs of WNV and contributed to WNV amplification.

The composition of the bird community did not seem to play a major role in the amplification of WNV in the Camargue region (no 'dilution effect'), unlike what was recently observed in the New World (Ezenwa 2006; Swaddle & Calos 2008; Allan 2009; Loss 2009).

Finally, the comparison between the equine risk index and seroprevalence in horses in the Camargue showed that the probability that both mosquito species are involved in the emergence process (*i.e.* the transmission of WNV to dead-end hosts) is very high. Although *Culex modestus* was identified as the main WNV amplifier species, the presence of *Culex pipiens* seems therefore essential to the transmission of WNV to horses.

Our objective was to develop a simple and robust GIS-based method to map the areas of WNV circulation in the Camargue area; thus, different simplifying assumptions have been made. In particular, here we assumed that virus transmission occurs in all areas where host-vector contacts are possible. Intensity of host-vector contacts, trophic preferences, virus properties as well as host immunity were not considered here, such that the resulting maps represent the maximum of the areas potentially infected by WNV. Moreover, the temporal cut-off into four seasons (spring, summer, fall and winter) may be considered too rough to describe the high variability of the vector dynamics. Future work could consist in refine this temporal cut-off to better describe the host-vector contacts between birds and *Culex modestus* and *Culex pipiens* during the amplification and emergence phases, respectively, and better understand the transmission mechanisms of WNV, in particular which bird species are involved in the amplification. Finally, different hypotheses of transmission were not tested here, as the bird-to-bird transmission (Hartemink 2007) or the existence of other competent vectors like ticks (Mumcuoglu 2005). Nevertheless, given the flexibility of the GIS tool, all of this different information or additional hypotheses can readily be integrated to refine the initial maps and produce the corresponding risk maps.

Conclusion

We provided a GIS-based framework to help understanding the complex interactions between hosts and vectors and their impact on the transmission of a multi-host pathogen, West Nile Virus. In this study, GIS modelling tools were appropriate to describe the high spatio-temporal variability of contacts between hosts and vectors communities in the Camargue region, Southern France, and to simulate different processes likely to play a role in WNV transmission. The confrontation of the resulting maps of WNV circulation in avian and equine populations with seroprevalence data suggested that some of the combinations of the different steps (introduction / amplification / emergence) do explain the observed patterns of WN virus transmission in the study area, whereas some hypotheses are probably not valid in the Camargue context. In particular, results highlighted the role of migrating bird populations in the introduction of the virus in the area and showed that a great number of bird species may act as reservoir of WNV, with no apparent ‘dilution effect’. Results also stressed the distinct roles of two vector species, *Culex modestus* and *Culex pipiens*, probably involved in the amplification and emergence processes, respectively.

Acknowledgments

This publication has been funded under the EU 6th Framework Program (GOCE-CT-2003-010284 EDEN: Emerging Diseases in a changing European eNvironment). It is officially catalogued by the EDEN Steering Committee as EDEN0XXX (www.eden-fp6project.net). The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission. The authors thank Benjamin Vollot, who participated in field work and bird database construction. We also thank Véronique Chevalier, CIRAD, and Benjamin Roche, IRD, for discussion.

References

- Abdelhaq, A. 1996 West Nile fever in horses in Morocco. *Bulletin de l'Office International des Epizooties* **108**, 867-869.
- Akaike, H. 1974 A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* **19**, 716-723.
- Allan, B. F., Langerhans, R. B., Ryberg, W. A., Landesman, W. J., Griffin, N. W., Katz, R. S., Oberle, B. J., Schutzenhofer, M. R., Smyth, K. N., de St Maurice, A., Clark, L., Crooks, K. R., Hernandez, D. E., McLean, R. G., Ostfeld, R. S. & Chase, J. M. 2009 Ecological correlates of risk and incidence of West Nile virus in the United States. *Oecologia* **158**, 699-708.
- Autorino, G. L., Battisti, A., Deubel, V., Ferrari, G., Forletta, R., Giovannini, A., Lelli, R., Murri, S. & Scicluna, M. T. 2002 West Nile virus epidemic in horses, Tuscany region, Italy. *Emerg Infect Dis* **8**, 1372-8.
- Balança, G., Gaidet, N., Savini, G., Vollot, B., Foucart, A., Reiter, P., Boutonnier, A., Lelli, R. & Monicat, F. 2009 Low West Nile virus circulation in wild birds in an area of recurring outbreaks in Southern France. *Vector Borne Zoonotic Dis* **9**, 737-41.
- Balenghien, T., Fouque, F., Sabatier, P. & Bicout, D. J. 2006 Horse-, bird-, and human-seeking behavior and seasonal abundance of mosquitoes in a West Nile Virus focus of southern France. *Journal of Medical Entomology* **43**, 936-946.
- Balenghien, T., Vazeille, M., Grandadam, M., Schaffner, F., Zeller, H., Reiter, P., Sabatier, P., Fouque, F. & Bicout, D. J. 2008 Vector competence of some French Culex and Aedes mosquitoes for West Nile virus. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* **8**, 589-95.
- Balenghien, T., Vazeille, M., Reiter, P., Schaffner, F., Zeller, H. & Bicout, D. J. 2007 Evidence of laboratory vector competence of Culex modestus for West Nile virus. *Journal of the American Mosquito Control Association* **23**, 233-6.
- Bouden, M., Moulin, B. & Gosselin, P. 2008 The geosimulation of West Nile virus propagation: a multi-agent and climate sensitive tool for risk management in public health. *Int J Health Geogr* **7**, 35.
- Bowman, C., Gumel, A. B., van den Driessche, P., Wu, J. & Zhu, H. 2005 A mathematical model for assessing control strategies against West Nile virus. *Bull Math Biol* **67**, 1107-33.
- Brown, H., Duik-Wasser, M., Andreadis, T. & Fish, D. 2008 Remotely-sensed vegetation indices identify mosquito clusters of West Nile virus vectors in an urban landscape in the northeastern United States. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **8**, 197-206.

- Burnham, K. & Anderson, D. 2004 Multi model inference. Understanding AIC and BIC in model selection. *Sociological methods & research* **33**, 261-304.
- Campbell, G. L., Marfin, A. A., Lanciotti, R. S. & Gubler, D. J. 2002 West Nile virus. *Lancet Infect Dis* **2**, 519-29.
- Chevalier, V., Dupressoir, A., Tran, A., Diop, O. M., Gottland, C., Diallo, M., Etter, E., Ndiaye, M., Grosbois, V., Dia, M., Gaidet, N., Sall, A. A., Soti, V. & Niang, M. 2010 Environmental risk factors of West Nile virus infection of horses in the Senegal River basin. *Epidemiol Infect* **1-9**.
- Cooke, W. H., 3rd, Grala, K. & Wallis, R. C. 2006 Avian GIS models signal human risk for West Nile virus in Mississippi. *Int J Health Geogr* **5**, 36.
- Cramp, S. & Simmons, K. 1977 *The birds of the Western Palearctic, Vol. 1*. Oxford University Press.
- Cramp, S. & Simmons, K. 1979 *The birds of the Western Palearctic, Vol. 2*. Oxford University Press.
- Cramp, S. & Simmons, K. 1982 *The birds of the Western Palearctic, Vol. 3*. Oxford University Press.
- Dauphin, G., Zientara, S., Zeller, H. & Murgue, B. 2004 West Nile: worldwide current situation in animals and humans. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **27**, 343-55.
- Durand, B., Balanca, G., Baldet, T. & Chevalier, V. 2010 A metapopulation model to simulate West Nile virus circulation in Western Africa, Southern Europe and the Mediterranean basin. *Vet Res* **41**, 32.
- Durand, B., Chevalier, V., Pouillot, R., Labie, J., Marendat, I., Murgue, B., Zeller, H. & Zientara, S. 2002 West Nile virus outbreak in horses, southern France, 2000: Results of a serosurvey. *Emerging Infectious Diseases* **8**, 777-782.
- Durand, B., Dauphin, G., Zeller, H., Labie, J., Schuffenecker, I., Murri, S., Moutou, F. & Zientara, S. 2005 Serosurvey for West Nile virus in horses in southern France. *Vet Rec* **157**, 711-3.
- Ezenwa, V. O., Godsey, M. S., King, R. J. & Guptill, S. C. 2006 Avian diversity and West Nile virus: testing associations between biodiversity and infectious disease risk. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **273**, 109-117.
- Ezenwa, V. O., Milheim, L. E., Coffey, M. F., Godsey, M. S., King, R. J. & Guptill, S. C. 2007 Land cover variation and West Nile virus prevalence: Patterns, processes, and implications for disease control. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **7**, 173-180.
- Farajollahi, A., Crans, W. J., Bryant, P., Wolf, B., Burkhalter, K. L., Godsey, M. S., Aspen, S. E. & Nasci, R. S. 2005 Detection of West Nile viral RNA from an overwintering pool of *Culex pipens pipiens* (Diptera: Culicidae) in New Jersey, 2003. *J Med Entomol* **42**, 490-4.
- Foley, D. H., Wilkerson, R. C. & Rueda, L. M. 2009 Importance of the "What," "When," and "Where" of Mosquito Collection Events. *Journal of Medical Entomology* **46**, 717-722.
- Gibbs, S. E. J., Wimberly, M. C., Madden, M., Masour, J., Yabsley, M. J. & Stallknecht, D. E. 2006 Factors affecting the geographic distribution of West Nile virus in Georgia, USA: 2002-2004. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **6**, 73-82.
- Hartemink, N. A., Davis, S. A., Reiter, P., Hubalek, Z. & Heesterbeek, J. A. 2007 Importance of bird-to-bird transmission for the establishment of West Nile virus. *Vector Borne Zoonotic Dis* **7**, 575-84.

Partie II – Travaux personnels et résultats

- Hubalek, Z. 2000a European experience with the West Nile virus ecology and epidemiology: could it be relevant for the New World? *Viral Immunol* **13**, 415-26.
- Hubalek, Z. & Halouzka, J. 1999 West Nile fever--a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis* **5**, 643-50.
- Hubalek, Z., Halouzka, J. & Juricova, Z. 1999 West Nile fever in Czechland. *Emerg Infect Dis* **5**, 594-5.
- Hubalek, Z., Halouzka, J., Juricova, Z., Sikutova, S., Rudolf, I., Honza, M., Jankova, J., Chytil, J., Marec, F. & Sitko, J. 2008 Serologic survey of birds for West Nile flavivirus in southern Moravia (Czech Republic). *Vector Borne Zoonotic Dis* **8**, 659-66.
- Hubalek, Z., Savage, H. M., Halouzka, J., Juricova, Z., Sanogo, Y. O. & Lusk, S. 2000b West Nile virus investigations in South Moravia, Czechland. *Viral Immunol* **13**, 427-33.
- Isenmann, P. 1993 *Oiseaux de Camargue. The Birds of Camargue*. Brunoy, France: Société d'Etudes Ornithologiques.
- Joubert, L., Oudar, J., Hannoun, C., Beytout, D., Corniou, B., Guillon, J. C. & Panthier, R. 1970 Epidemiologie du virus West Nile: Etude d'un foyer en Camargue IV - La meningo-encephalomyelite du cheval. *Annales de l'Institut Pasteur (Paris)* **118**, 239-247.
- Jourdain, E., Schuffenecker, I., Korimbocus, J., Reynard, S., Murri, S., Kayser, Y., Gauthier-Clerc, M., Sabatier, P. & Zeller, H. G. 2007a West Nile virus in wild resident birds, Southern France, 2004. *Vector Borne Zoonotic Dis* **7**, 448-52.
- Jourdain, E., Toussaint, Y., Leblond, A., Bicout, D. J., Sabatier, P. & Gauthier-Clerc, M. 2007b 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* **7**, 15-33.
- Keesing, F., Holt, R. D. & Ostfeld, R. S. 2006 Effects of species diversity on disease risk. *Ecology Letters* **9**, 485-498.
- Komar, N., Langevin, S., Hinten, S., Nemeth, N., Edwards, E., Hettler, D., Davis, B., Bowen, R. & Bunning, M. 2003 Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerg Infect Dis* **9**, 311-22.
- Leblond, A., Sandoz, A., Lefebvre, G., Zeller, H. & Bicout, D. J. 2007 Remote sensing based identification of environmental risk factors associated with West Nile disease in horses in Camargue, France. *Prev Vet Med* **79**, 20-31.
- Liu, A., Lee, V., Galusha, D., Slade, M. D., Diuk-Wasser, M., Andreadis, T., Scotch, M. & Rabinowitz, P. M. 2009 Risk factors for human infection with West Nile Virus in Connecticut: a multi-year analysis. *Int J Health Geogr* **8**, 67.
- Liu, R., Shuai, J., Wu, J. & Zhu, H. 2006 Modeling spatial spread of west nile virus and impact of directional dispersal of birds. *Math Biosci Eng* **3**, 145-60.
- Lopez, G., Jimenez-Clavero, M. A., Tejedor, C. G., Soriguer, R. & Figuerola, J. 2008 Prevalence of West Nile virus neutralizing antibodies in Spain is related to the behavior of migratory birds. *Vector Borne Zoonotic Dis* **8**, 615-21.
- Lord, C. C. & Day, J. F. 2001 Simulation studies of St. Louis encephalitis and West Nile viruses: the impact of bird mortality. *Vector Borne Zoonotic Dis* **1**, 317-29.

- Loss, S. R., Hamer, G. L., Walker, E. D., Ruiz, M. O., Goldberg, T. L., Kitron, U. D. & Brawn, J. D. 2009 Avian host community structure and prevalence of West Nile virus in Chicago, Illinois. *Oecologia* **159**, 415-24.
- Lvov, D. K., Butenko, A. M., Gromashevsky, V. L., Larichev, V. P., Gaidamovich, S. Y., Vyshemirsky, O. I., Zhukov, A. N., Lazorenko, V. V., Salko, V. N., Kovtunov, A. I., Galimzyanov, K. M., Platonov, A. E., Morozova, T. N., Khutoretskaya, N. V., Shishkina, E. O. & Skvortsova, T. M. 2000 Isolation of two strains of West Nile virus during an outbreak in southern Russia, 1999. *Emerg Infect Dis* **6**, 373-6.
- Medlock, J. M., Snow, K. R. & Leach, S. 2005 Potential transmission of West Nile virus in the British Isles: an ecological review of candidate mosquito bridge vectors. *Med Vet Entomol* **19**, 2-21.
- Mongoh, M. N., Khaitsa, M. L. & Dyer, N. W. 2007 Environmental and ecological determinants of West Nile virus occurrence in horses in North Dakota, 2002. *Epidemiol Infect* **135**, 57-66.
- Mouchet, J., Rageau, J., Laumond, C., Hannoun, C., Beytout, D., Oudar, J., Corniou, B. & Chippaux, A. 1970 Epidémiologie du virus West Nile: étude d'un foyer en Camargue V. Le vecteur: *Culex modestus* Ficalbi Diptera; Culicidae. *Annales de l'Institut Pasteur (Paris)* **118**, 839-855.
- Mumcuoglu, K. Y., Banet-Noach, C., Malkinson, M., Shalom, U. & Galun, R. 2005 Argasid ticks as possible vectors of West Nile virus in Israel. *Vector Borne Zoonotic Dis* **5**, 65-71.
- Murgue, B., Murri, S., Zientara, S., Durand, B., Durand, J. P. & Zeller, H. 2001 West Nile outbreak in horses in Southern France, 2000: The return after 35 years. *Emerging Infectious Diseases* **7**, 692-696.
- Naowarat, S. & Tang, I. M. 2004 Effect of bird-to-bird transmission of the West Nile virus on the dynamics of the transmission of this disease. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **35**, 162-6.
- 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. 2001 West Nile virus in overwintering Culex mosquitoes, New York City, 2000. *Emerg Infect Dis* **7**, 742-4.
- Ostfeld, R. & Keesing, F. 2000 The function of biodiversity in the ecology of vector-borne zoonotic diseases. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* **78**, 2061-2078.
- Ozdenerol, E., Bialkowska-Jelinska, E. & Taff, G. N. 2008 Locating suitable habitats for West Nile Virus-infected mosquitoes through association of environmental characteristics with infected mosquito locations: a case study in Shelby County, Tennessee. *Int J Health Geogr* **7**, 12.
- Platonov, A. E., Shipulin, G. A., Shipulina, O. Y., Tyutyunnik, E. N., Frolochkina, T. I., Lanciotti, R. S., Yazyshina, S., Platonova, O. V., Obukhov, I. L., Zhukov, A. N., Vengerov, Y. Y. & Pokrovskii, V. I. 2001 Outbreak of West Nile virus infection, Volgograd Region, Russia, 1999. *Emerg Infect Dis* **7**, 128-32.
- Poncon, N., Toty, C., L'Ambert, G., le Goff, G., Brengues, C., Schaffner, F. & Fontenille, D. 2007 Population dynamics of pest mosquitoes and potential malaria and West Nile virus vectors in relation to climatic factors and human activities in the Camargue, France. *Med Vet Entomol* **21**, 350-7.
- Pradel, J., Chalvet Monfray, K., Molia, S., Vachieri, N., Rousteau, A., Imbert, D., Martinez, D., Sabatier, P. & Lefrancois, T. 2009 Risk factors for West Nile virus seropositivity of equids in Guadeloupe. *Prev Vet Med* **92**, 71-8.

Partie II – Travaux personnels et résultats

- Pradier, S., Leblond, A. & Durand, B. 2008 Land cover, landscape structure, and West Nile virus circulation in southern France. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **8**, 253-263.
- Rappole, J. H., Compton, B. W., Leimgruber, P., Robertson, J., King, D. I. & Renner, S. C. 2006 Modeling movement of West Nile virus in the Western hemisphere. *Vector Borne Zoonotic Dis* **6**, 128-39.
- Rappole, J. H. & Hubalek, Z. 2003 Migratory birds and West Nile virus. *J Appl Microbiol* **94 Suppl**, 47S-58S.
- Reisen, W. K. 2010 Landscape epidemiology of vector-borne diseases. *Annu Rev Entomol* **55**, 461-83.
- Rioux, J. A. 1958 *Les Culicidés du "Midi méditerranéen". Etude systématique et écologique*. Paris, France: Editions Paul Lechevalier.
- Rioux, J. A. & Arnold, M. 1955 *Les Culicidés de Camargue (étude systématique et écologique)*. Paris, France: Société Nationale d'Acclimatation
- Ruiz, M. O., Walker, E. D., Foster, E. S., Haramis, L. D. & Kitron, U. D. 2007 Association of West Nile virus illness and urban landscapes in Chicago and Detroit. *Int J Health Geogr* **6**, 10.
- Savage, H. M., Ceianu, C., Nicolescu, G., Kearabatsos, N., Lanciotti, R., Vladimirescu, A., Laiv, L., Ungureanu, A., Romanca, C. & Tsai, T. F. 1999 Entomological and avian investigation of an epidemic of West Nile fever in Romania in 1996, with serologic and molecular characterization of a virus isolate from mosquitoes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **61**, 600-611.
- Savini, G., Monaco, F., Calistri, P. & Lelli, R. 2009 Phylogenetic analysis of West Nile virus isolated in Italy in 2008. *Eurosurveillance* **13**,
- Schaffner, F., Angel, G., Geoffroy, B., Hervy, J.-P., Rhaeim, A. & Brunhes, J. 2001 *The mosquitoes of Europe*. Paris, France: IRD Editions and EID Méditerranée.
- Service, M. W. 1969 Observations on the ecology of some British mosquitoes. *Bulletin of Entomological Research* **59**, 161–194.
- Service, M. W. 1997 Mosquito (Diptera: Culicidae) dispersal--the long and short of it. *J Med Entomol* **34**, 579-88.
- Shaman, J. 2007 Amplification due to spatial clustering in an individual-based model of mosquito-avian arbovirus transmission. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **101**, 469-83.
- Sudia, W. D. & Chamberlain, R. W. 1962 Battery-operated light trap, an improved model. *Mosquito News* **22**, 126-129.
- Swaddle, J. P. & Calos, S. E. 2008 Increased avian diversity is associated with lower incidence of human West Nile infection: observation of the dilution effect. *PLoS One* **3**, e2488.
- Thomas, D. M. & Urena, B. 2001 A model describing the evolution of West Nile-like encephalitis in New York City. *Mathematical and Computer Modelling* **34**, 771-781.
- Tran, A., Gaidet, N., L'Ambert, G., Balenghien, T., Balança, G., Chevalier, V., Soti, V., Ivanès, C., Etter, E., Schaffner, F., Baldet, T. & De la Rocque, S. 2007 The use of remote sensing for the ecological description of multi-host disease systems: a case study on West Nile virus in southern France. *Veterinaria Italiana* **43**, 687-697.

- Tsai, T. F., Popovici, F., Cernescu, C., Campbell, G. L. & Nedelcu, N. I. 1998 West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet* **352**, 767-71.
- Vinogradova, E. B. 2000 *Culex pipiens pipiens mosquitoes: taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics, applied importance and control*. SoPa-Moscow, Russia: PENSOFT Publishers.
- Ward, M. P. 2005 Epidemic West Nile virus encephalomyelitis: A temperature-dependent, spatial model of disease dynamics. *Preventive Veterinary Medicine* **71**, 253-264.
- Ward, M. P., Wittich, C. A., Fosgate, G. & Srinivasan, R. 2009 Environmental risk factors for equine West Nile virus disease cases in Texas. *Veterinary Research Communications* **33**, 461-471.
- Wonham, M. J., de-Camino-Beck, T. & Lewis, M. A. 2004 An epidemiological model for West Nile virus: invasion analysis and control applications. *Proc Biol Sci* **271**, 501-7.
- Zeller, H. G. & Schuffenecker, I. 2004 West Nile virus: An overview of its spread in Europe and the Mediterranean Basin in contrast to its spread in the Americas. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **23**, 147-156.

Partie II – Travaux personnels et résultats

Tables

Table 1: Level of risk of amplification by the vector population attributed to each habitat according to the abundance of both mosquito species.

<i>Cx modestus</i> / <i>Cx pipiens</i>	Absent	Very low densities	Low densities	High densities	Very high densities
Absent	0	0	0	0	0
Very low densities	0	1	1	2	3
Low densities	0	1	2	3	3
High densities	0	2	3	3	3
Very high densities	0	3	3	3	3

Table 2: Summary of the selection statistics for the top ten regression models evaluating the variation in seroprevalence in magpies' populations, in relation to avian risk indices resulting from the different scenarios of introduction and amplification, Camargue area, France. Models are ordered from best to worst among a set of 75 candidate models. The three first models can be considered having substantial support ($\Delta_{AIC} \leq 2$) (bold text).

Scenario	Introduction	Vector amplification	Host amplification	Diversity effect	AIC	Δ_{AIC}	w_{AIC}
I_{1b}A₁₃₁	Migratory bird from Eastern and Northern Europe	<i>Culex modestus</i>	All species	No dilution effect	64.387	0.000	0.204
I_{1b}A₃₃₁	Migratory bird from Eastern and Northern Europe	<i>Culex modestus</i> and <i>Culex pipiens</i>	All species	No dilution effect	64.387	0.000	0.204
I_{1a}A₁₃₁	Migratory bird from sub-saharan Africa and Maghreb	<i>Culex modestus</i>	All species	No dilution effect	65.933	1.546	0.094
I _{1b} A ₃₂₁	Migratory bird from Eastern and Northern Europe	<i>Culex modestus</i> and <i>Culex pipiens</i>	Some competent species	No dilution effect	68.147	3.759	0.031
I _{1b} A ₁₂₂	Migratory bird from Eastern and Northern Europe	<i>Culex modestus</i>	Some competent species	Dilution effect	68.303	3.915	0.029
I _{1b} A ₃₂₂	Migratory bird from Eastern and Northern Europe	<i>Culex modestus</i> and <i>Culex pipiens</i>	Some competent species	Dilution effect	68.370	3.983	0.028
I _{1b} A ₁₂₁	Migratory bird from Eastern and Northern Europe	<i>Culex modestus</i>	Some competent species	No dilution effect	68.436	4.049	0.027
I _{1a} A ₁₂₂	Migratory bird from sub-saharan Africa and Maghreb	<i>Culex modestus</i>	Some competent species	Dilution effect	68.568	4.181	0.025
I _{1a} A ₃₂₂	Migratory bird from sub-saharan Africa and Maghreb	<i>Culex modestus</i> and <i>Culex pipiens</i>	Some competent species	Dilution effect	69.107	4.720	0.019
I _{1a} A ₁₂₁	Migratory bird from sub-saharan Africa and Maghreb	<i>Culex modestus</i>	Some competent species	No dilution effect	69.198	4.811	0.018

Partie II – Travaux personnels et résultats

Table 3: Summary of the selection statistics for the top six regression models evaluating the variation in seroprevalence in equine populations, in relation to equine risk indices resulting from the different scenarios of introduction, amplification and emergence, Camargue area, France. Models are ordered from best to worst among a set of 93 candidate models. The first model can be unambiguously selected as the best model (in bold).

Scenario	Introduction	Vector amplification	Host amplification	Diversity effect	Emergence	AIC	Δ_{AIC}	W_{AIC}
IIaA121E3	Migratory bird from sub-saharan Africa and Maghreb	<i>Culex modestus</i>	Some competent species	No dilution effect	<i>Culex modestus</i> and <i>Culex pipiens</i>	725.539	0.000	0.568
IIbA131E3	Migratory bird from Eastern and Northern Europe	<i>Culex modestus</i>	All species	No dilution effect	<i>Culex modestus</i> and <i>Culex pipiens</i>	728.330	2.791	0.141
IIbA331E3	Migratory bird from Eastern and Northern Europe	<i>Culex modestus</i> and <i>Culex pipiens</i>	All species	No dilution effect	<i>Culex modestus</i> and <i>Culex pipiens</i>	728.330	2.791	0.141
IIaA131E3	Migratory bird from sub-saharan Africa and Maghreb	<i>Culex modestus</i>	All species	No dilution effect	<i>Culex modestus</i> and <i>Culex pipiens</i>	729.403	3.864	0.082
I2aA121E3	Virus overwintering <i>Culex modestus</i>	<i>Culex modestus</i>	Some competent species	No dilution effect	<i>Culex modestus</i> and <i>Culex pipiens</i>	732.239	6.700	0.020
I2aA122E3	Virus overwintering <i>Culex modestus</i>	<i>Culex modestus</i>	Some competent species	Dilution effect	<i>Culex modestus</i> and <i>Culex pipiens</i>	732.239	6.700	0.020

Table 4: Relative importance of the different hypotheses of introduction, amplification and emergence explaining variations in magpies and horses seroprevalence data, Camargue area, France, based on their normalized Akaike weights (w_{AIC}). Bold text depicts the hypothesis having the higher support from the data.

Step	Hypothesis		Code	w_{AIC} (avian risk index)		w_{AIC} (equine risk index)	
Introduction	Introduction by migratory birds	From Sub-saharan Africa and Maghreb	I_{1a}	0.774	0.221	0.95	0.662
		From Eastern and Northern Europe	I_{1b}		0.553		0.288
	Virus overwintering	<i>Culex modestus</i>	I _{2a}	0.226	0.090	0.053	0.046
		<i>Culex pipiens</i>	I _{2b}		0.066		0.002
		Both species	I _{2c}		0.070		0.002
	Amplification	Vector amplification	<i>Culex modestus</i>	A_{1xx}	0.499	0.847	
<i>Culex pipiens</i>			A _{2xx}	0.131	0.002		
Both species			A _{3xx}	0.370	0.151		
Reservoir amplification		Magpies and sparrows	A _{x1x}	0.095	<0.001		
		Some competent species	A_{x2x}	0.344	0.627		
		All bird species	A_{x3x}	0.561	0.373		
Diversity effects		No dilution effect	A_{xx1}	0.773	0.973		
	Dilution effect	A _{xx2}	0.227	0.027			
Emergence	Emergence	<i>Culex modestus</i>	E ₁	-	0.012		
		<i>Culex pipiens</i>	E ₂	-	0.005		
		Both species	E₃	-	0.983		

Figure captions

Figure 1: Location of the study area and main land cover types, Camargue region, France.

Figure 2: Schematic representation of the different scenarios of introduction, amplification and emergence of West Nile virus in the Camargue region, France.

Figure 3: Classical scheme showing how vector, host, and pathogen populations intersect to enable pathogen transmission (adapted from (Reisen 2010)).

Figure 4: Conceptual representation of the construction of a ‘scenario’ of WNV transmission. a: Identification of the areas where the virus introduction is followed by an amplification (I/A). b: Spread of the virus from the I/A areas by avian populations. c: Identification of the areas of WNV emergence in sensitive hosts resulting from the I/A process (I/A/E).

Figure 5: Conceptual representation of the different steps to model different WNV possible scenarios and create the corresponding maps in a GIS environment.

Figure 6: Results of seroprevalence studies in magpies and horses and examples of maps of WNV amplification in the avian population (avian risk index) and WNV emergence in the equine population (equine risk index), Camargue, France. a: scenario $I_{1b}A_{131}$; b: scenario $I_{1a}A_{121}E_3$; c: scenario $I_{2c}A_{231}$; scenario $I_{1a}A_{122}E_3$.

Figures

Figure 1

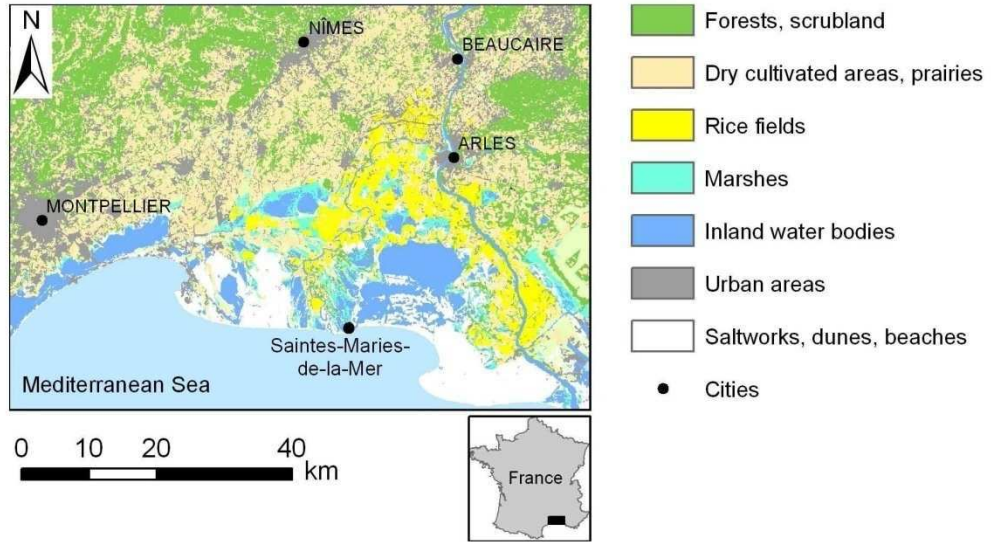


Figure 2

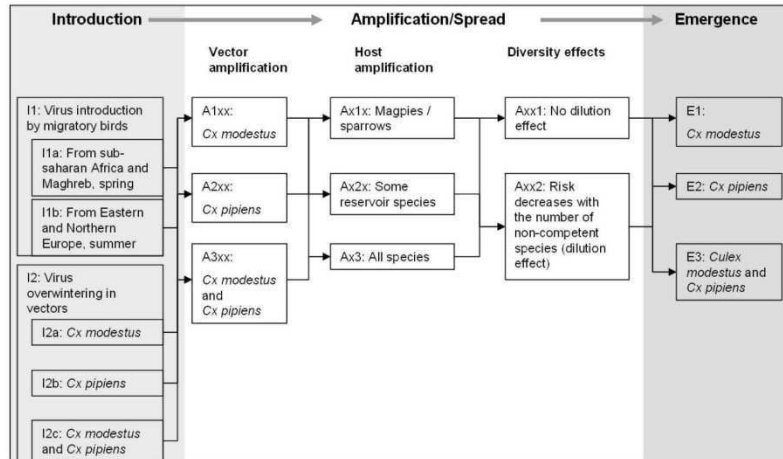


Figure 3

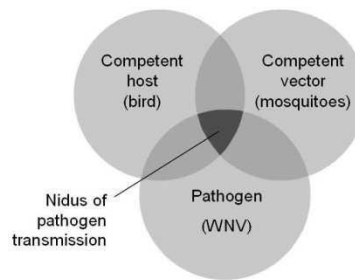


Figure 4

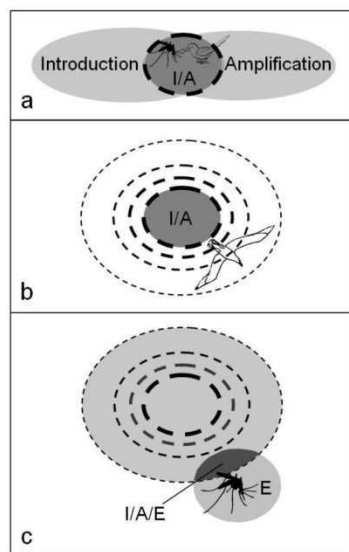


Figure 5

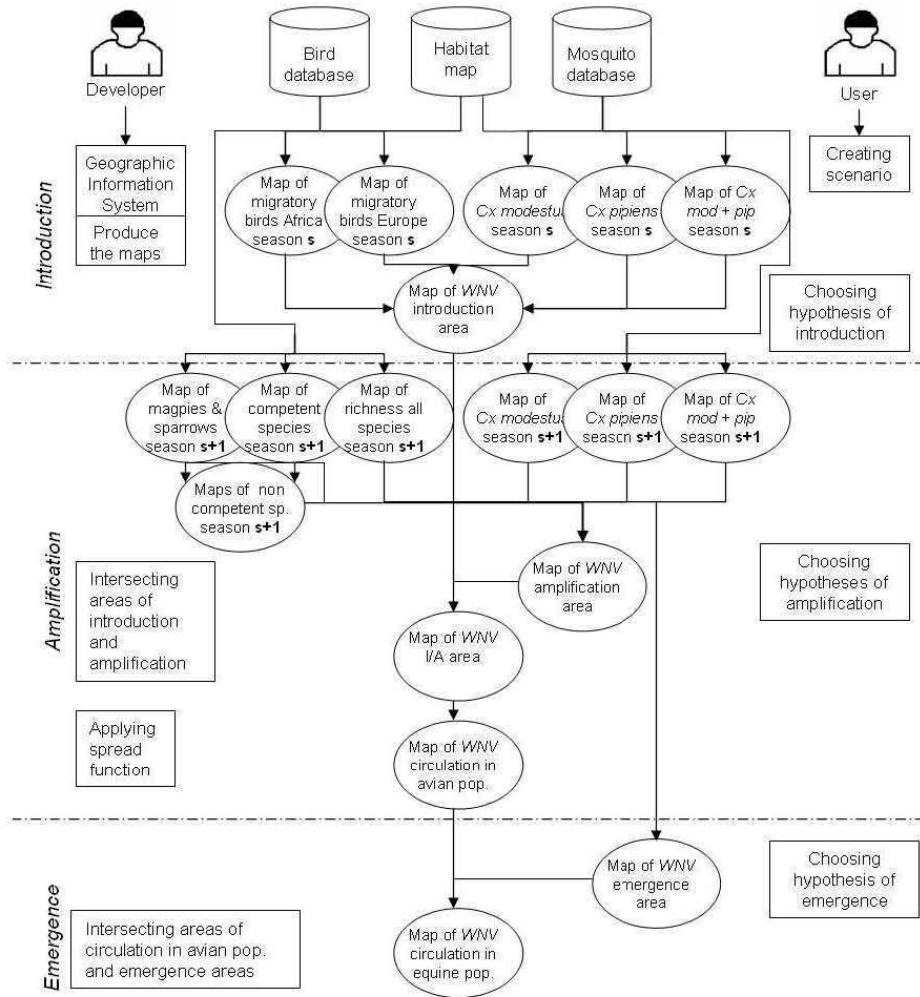
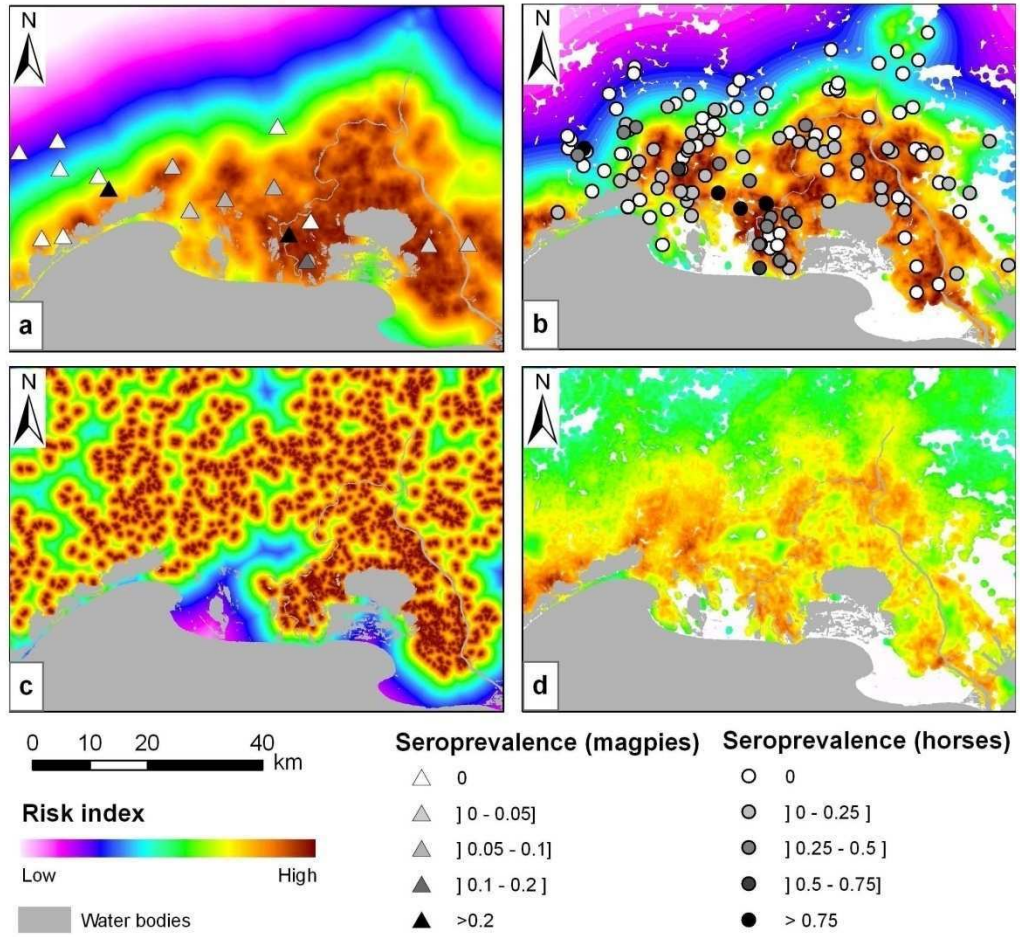


Figure 6



Supplementary Information

1. Description of the spatio-temporal distribution of *Culex* mosquitoes.

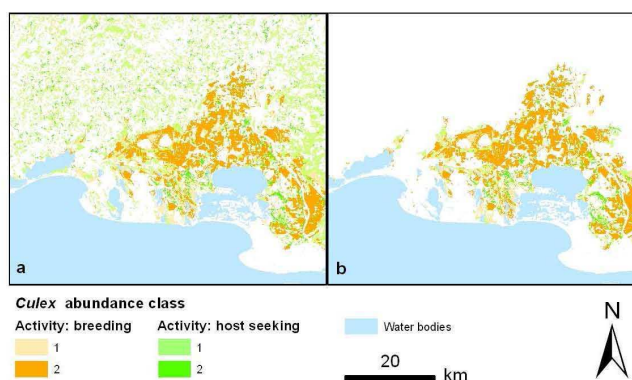
We used the mosquito database information and GIS functionalities to map the most realistic distribution of mosquitoes for each season, taking into account their short dispersal distance around their breeding sites. This active dispersal for mosquitoes usually covers short distances, such as a few hundred meters, although longer flights of >1 km may be necessary if hosts and oviposition sites are widely separated (Service 1997).

In a first step, for each season, each activity and each species, a value of mosquito abundance index was attributed to each object in the land cover map with respect to its land cover type, according to the mosquito database. Nevertheless, in these first maps, all potential host-seeking sites with the same land cover have the same abundance index, even if they are farther from breeding sites than the active dispersal distance, which is not realistic (see example Figure S1a). Thus, to take into account the short dispersal distance of mosquitoes from their breeding sites, we used the following process in order to select the real host-seeking sites:

- Among all objects of the land cover map, the main breeding sites (defined as objects with an abundance class ≥ 2) were selected.
- Then, the secondary breeding sites (abundance class = 1) and main host-seeking sites (abundance class ≥ 2) neighbouring the current selection were added to it during an iterative process.
- Finally, the secondary host-seeking sites (abundance class = 1) neighbouring the selection were added to it.
- All selected objects retained the maximum abundance class value between the values defined for host-seeking and breeding activities in the mosquito database, whereas all the others took a value of zero (see example Figure S1b).

The whole process was repeated for each species and each season.

Figure S1: Example of the process for mapping mosquito distribution. a) Map of mosquito abundance index directly derived from the mosquito database. In this first map, all potential host-seeking sites (in green) have the same abundance index, even if they are very far from breeding sites (in orange) than the active dispersal distance. b) Map of mosquito abundance index once the dispersal distance of mosquitoes from their breeding sites is taken into account in the geographic model. The real host-seeking sites are those connected to breeding sites. The examples are illustrated for *Culex modestus* in spring season.



Partie II – Travaux personnels et résultats

2. Assessment of the mosquito distribution maps

Mosquito collections were carried out using carbon dioxide (CO₂)-baited traps to assess the abundances of *Cx. modestus* and *Cx. pipiens* in different seasons and locations in the aim to assess the accuracy of mosquito distribution maps. Miniature CDC (Centers for Disease Control) traps (John W. Hock Co., Gainesville, FL, U.S.A.) (Sudia & Chamberlain 1962) without light and baited with CO₂ dry ice were set overnight (from 18:00 to 10:00) in a location protected from wind exposure for two consecutive nights.

Because sampling mosquitoes in each of the 27 land cover types issued from the land cover map would not be very practical, we limited it to 8. The 8 land cover types chosen were representative of the abundance classes for *Culex pipiens* and *Culex modestus*, according to the mosquito database. These 8 land cover types were sampled in different locations and seasons (Table S1). Each mosquito collection was georeferenced using a Global Positioning System receiver (Foley 2009).

Collections were conducted three times during 2007: between May 21 and June 8 for “Spring”, between August 28 and 30 for “Summer”, and October 3 and 17 for “Fall”. Good meteorological conditions in the area (neither rain nor wind) were required to conduct the trapping: when the weather was unfavourable, the sampling was delayed. A special effort was made to trap in different places during the same night and to minimize the time between the first and last collections for each season.

Mosquitoes were identified down to species using standard morphological identification keys (Schaffner 2001).

In addition, we used data of *Culex modestus* and *Culex pipiens* abundances collected in 2005 and 2006 in the Camargue area with similar protocols (Poncon 2007, L'Ambert, unpublished data). These data were collected for population dynamics studies by capturing mosquitoes for two consecutive nights, once every two weeks. We used data collected between April 3 and June 8 for “Spring”, August 22 and 30 for “Summer”, and October 2 and 20 for “Fall”.

In total, 100 different places were sampled in the 8 land cover types, corresponding to 451 trap-nights (Table S1).

Table S1. Number of trap locations and corresponding trap-nights per land cover type and season, Camargue, France, 2007.

Abundance class*	Land cover	Spring**	Summer**	Fall**	Total**
0 (absent)	Salt marsh vegetation	7 (48)	2 (12)	3 (6)	12 (66)
	Scrubland	3 (13)	3 (10)	3 (6)	9 (29)
1 - 2 (very low to low densities)	Clear water	3 (26)	2 (12)	2 (6)	7 (44)
	Rush prairies never flooded	3 (28)	3 (21)	2 (6)	8 (55)
	Marshes with <i>scirpus</i> and rushes	6 (36)	5 (34)	3 (6)	14 (76)
3 - 4 (high to very high densities)	Reed beds	8 (26)	9 (59)	9 (17)	26 (102)
	Rice fields	6 (15)	8 (17)	4 (8)	18 (40)
	Suburban areas	2 (16)	2 (19)	2 (4)	6 (39)
Total		38 (208)	34 (184)	28 (59)	100 (451)

28

* Maximum class abundance for *Culex pipiens* and *Culex modestus*, all seasons, according to the mosquito database

** Number of trap locations (*number of trap-nights*)

To take into account the distance at which CO₂-traps were most attractive to mosquitoes, an abundance index was defined as the average of the abundance class values encountered within a buffer zone around the trap location (radius=200m). The correlations were significant, with a better fit between the abundance index and the observed abundances for *Cx. modestus* (Spearman $r=0.68$, $p<10^{-17}$) than *Cx. pipiens* (Spearman $r=0.58$, $p<10^{-9}$).

3. Assessment of the bird database from field observations

A standard 10 minutes point count census method was used to assess bird species abundance. Points were selected ensuring that detection of birds was high (e.g. forest songbirds were only counted in spring early in the morning when songs are the most frequent), and were located in order to cover most of the study area.

A total of 819 bird point counts were conducted in 11 different habitats, over 1-3 seasons (not in winter) and birds abundance was evaluated in 18 habitat-season units out of a total of 108 units (27 habitats x 4 seasons). 33-56 (mean 45) bird point counts were conducted in each of the 18 habitat-season units and resulted in 506 assessments of specific bird abundance (number of birds contacted in 15 minutes). At each season, the mean of specific bird abundances has been calculated. As expected, the means increase from uncommon to common birds (Table S2). In order to compare the abundance during point counts, of birds classified in distinct a priori abundance categories, we computed Wilcoxon test for comparison of means. For these tests, we considered series of values for each abundance category; each value in a series was the mean of abundances measured during the point count sessions. A distinct test was computed for each pair of abundance category and each of the three seasons, giving rise to nine comparison tests. Each test resulted in a significant difference (Table S3), indicating that the three abundance categories (uncommon, frequent, common) given in the bird data base are on average correct. The difference is less significant in autumn between common and frequent species, likely because of an under-estimation of the dispersion of birds after breeding.

Table S2: Mean abundances of birds measured during the point count sessions in relation to abundance categories.

Abundance category	spring	summer	autumn
common	1,21	3,57	2,58
frequent	0,98	1,08	0,68
uncommon	0,19	0,37	0,51

Partie II – Travaux personnels et résultats

Table S3: Results of Wilcoxon test conducted for comparison of mean abundances.

		frequent	uncommon
spring	common	***	****
	frequent		****
summer	common	***	****
	frequent		****
autumn	common	*	**
	frequent		***

*: p<0.1; **: p<0.05; ***: p<0.01; ****: p<0.001

III. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif de notre travail était d'identifier et de caractériser les zones à risque de circulation enzootique du virus WN, en utilisant la Camargue comme zone d'étude principale et des données sérologiques équines comme indicateur de cette circulation. En étudiant le lien direct existant entre cet indicateur de circulation et l'environnement, plusieurs facteurs de risque environnementaux ont été identifiés (classes d'occupation du sol : zones agricoles hétérogènes, végétation inondée... et certains indices de paysage). Des hypothèses de transmission du virus WN en Camargue ont également été testées. L'ensemble de ces travaux a permis de tracer des cartes de risque pour la circulation enzootique du virus WN et d'améliorer nos connaissances sur le cycle épidémiologique du virus en Camargue.

A. Mise en œuvre du travail et méthodologie

Echantillon

L'échantillon conséquent d'écuries et de chevaux suivis depuis de nombreuses années dans la zone d'étude principale est à la base du travail entrepris pendant cette thèse. Etant donné le grand nombre de sérums collectés (1770 en 2003-2004 et 1161 en 2007-2008) associé au recueil longitudinal de données sur les chevaux et les écuries depuis 2001, les études présentées ont bénéficié d'une puissance statistique supérieure à 80 % pour l'estimation de la prévalence et d'une grande fiabilité sur les données collectées. La question de la représentativité de l'échantillon par rapport à la population équine générale peut être posée, en particulier si les résultats de ces travaux devaient être généralisés. Comme nous l'avons vu dans la première partie de ce document, la Camargue comporte de nombreuses particularités concernant la filière équine, de par l'élevage du cheval Camargue spécifique de cette région et les mouvements de chevaux liés souvent à la gestion particulière du cheval dans cette zone. Par contre il a été démontré que le taux de renouvellement des chevaux dans les structures équestres de cette région est faible, ce qui nous a permis d'effectuer un suivi des chevaux. Notre échantillon paraît représentatif de la population équine présente dans le Sud de la France, mais une généralisation à d'autres zones du pays ou à d'autres pays serait à effectuer avec prudence.

Dans les études présentées, un biais de sélection existe lors du choix des chevaux prélevés dans les écuries. Ce choix ne peut pas être aléatoire, car c'est le propriétaire qui décide finalement des chevaux prélevés. En premier lieu, ce choix est effectué sur des critères de docilité des chevaux : il ne serait pas raisonnable de mettre en danger le propriétaire, le cheval et le manipulateur pour une étude basée sur le volontariat. Le choix a donc concerné des chevaux manipulables dans les conditions de l'écurie concernée : certaines disposaient d'un travail, ce qui a permis de prélever des chevaux impossibles à tenir en main. Dans un deuxième temps, le choix était guidé par le temps disponible pour faire les prélèvements avec le propriétaire, ainsi que la proximité et la facilité d'accès des chevaux.

Une autre difficulté importante à souligner, rencontrée pendant les enquêtes, est l'existence de sous-groupes de chevaux dans une même écurie ayant un mode de vie très différent (activité, logement, état sanitaire). Certains sous-groupes ne sont jamais prélevés (juments poulinières dans les marais, jeunes mâles isolés des autres chevaux...) et d'autres le sont systématiquement, comme par exemple les chevaux de travail des gardians. Nous nous sommes donc attachés à prendre des informations précises sur chaque cheval prélevé et à relever les coordonnées géographiques de chaque site visité, pour pouvoir prendre en compte ces différences.

Enfin les déplacements de chevaux ont été un problème à prendre en compte, en particulier les changements de pâtures pendant plusieurs semaines. En effet nous avons besoin de caractériser l'environnement autour des chevaux prélevés au moment de la saison à risque pour une circulation du virus WN, c'est-à-dire en période d'activité des moustiques. Des mouvements ont lieu pendant cette période, souvent dans un petit rayon autour de l'écurie. Si la distance entre l'écurie principale et la pâture était de plus d'1 km, nous avons relevé systématiquement les coordonnées géographiques. D'autre part, nous avons fait le choix d'effectuer les enquêtes en fin de printemps et début d'été, à la fois pour voir les chevaux à l'endroit où ils sont pendant la période à risque, mais aussi pour éviter la période de forte circulation virale, c'est-à-dire en août et septembre. Enfin l'environnement a été étudié dans un périmètre autour des écuries, dont le choix de la surface a été adapté en fonction de ces éléments.

Résultats sérologiques versus cas cliniques

Nous avons choisi comme indicateur de la circulation enzootique du virus WN chez le cheval, le dosage des Immunoglobulines G (IgG), anticorps spécifiquement dirigés contre le virus WN et persistants au moins plus d'une année, voire à vie (Ostlund et al. 2001). Le dosage de ces IgG est donc bien adapté à la détection d'un contact du cheval avec le virus WN, sans qu'il soit crucial d'en déterminer la date. Si l'objectif avait été de détecter un contact récent, le dosage des IgM aurait été plus adapté, puisque ces anticorps sont synthétisés précocement après une infection et ne persistent que quelques mois (Davidson et al. 2005). Le dosage des IgG a été réalisé selon la même méthode analytique (test ELISA) pour tous les sérums équins utilisés dans les études de ce document. La sensibilité et spécificité du test utilisé ont été évaluées à 100 % par le laboratoire commercialisant le test et au moins équivalentes à la méthode de référence OIE (séroneutralisation) par le laboratoire de virologie de Maisons-Alfort dans un rapport de validation interne (Annexe 3). Dans la littérature, il est souvent mentionné que l'interprétation des résultats sérologiques concernant le virus WN peut être perturbée par des réactions croisées avec les antigènes d'autres membres du sérocomplexe de l'encéphalite japonaise. Les virus concernés ne circulent pas en France : Alfuy, virus de l'encéphalite japonaise, Kokobera, Koutango, Kunjin, le virus de l'encéphalite de Murray Valley, le virus de l'encéphalite Saint Louis, Stratford et enfin Usutu (Komar 2000). Sur les sérums positifs en ELISA, nous avons tout de même effectué des séroneutralisations qui ont toutes confirmé le résultat obtenu par le test ELISA.

Nos études ne se sont pas basées sur les cas cliniques de maladie de West Nile chez le cheval car l'objectif était de détecter une circulation enzootique du virus en population équine. Or nous savons actuellement par des études épidémiologiques et d'infections expérimentales que seulement 10 % des chevaux infectés par le virus WN montrent des signes neurologiques (Bunning et al. 2002, Castillo-Olivares et al. 2004). En se basant seulement sur les cas cliniques équins, la majeure partie des zones de circulation enzootique n'aurait pas été détectée. Quand l'étude de l'émergence de la maladie de West Nile sera abordée, il sera alors pertinent de changer d'indicateur et de s'intéresser aux cas cliniques.

Données environnementales

Dans le premier article sur l'étude du paysage et la circulation du virus WN en Camargue et dans le Var, des données Corine Land Cover (CLC) acquises en 2000 avec une résolution spatiale de 100 m ont été utilisées. Les classes d'occupation du sol et les indices de paysage étudiés dans cette étude sont considérés comme relativement stables dans le temps, contrairement à d'autres données environnementales comme les changements saisonniers de végétation ou les durées de submersion des milieux. Ce type de source nous paraissait bien adapté à l'objectif de cette étude qui était de faire le lien entre une circulation enzootique du virus et des conditions environnementales favorables. De plus ces images satellitales CLC étaient disponibles, interprétées et validées selon la même méthode pour toute l'Europe et le bassin méditerranéen. Ces caractéristiques nous ont permis de construire une carte de risque pour le pourtour méditerranéen français. Dans le deuxième article sur l'influence de l'eau sur la circulation du virus WN en Camargue, l'objectif était différent, puisque notre intérêt était centré sur l'eau. Cet élément évolue beaucoup plus dans le temps et nécessite une échelle d'étude plus fine. Nous avons donc décidé de changer de source de données en choisissant des images acquises en même temps que les données sérologiques et avec une résolution spatiale plus importante (Landsat 30 m) pour pouvoir prendre en compte également des milieux humides de petite taille. Dans le dernier article concernant les mécanismes de transmission du virus WN en Camargue, la résolution spatiale de l'image satellitale utilisée (Landsat 30 m) a également été choisie pour pouvoir caractériser au mieux les distributions spatiales des Moustiques et Oiseaux potentiellement impliqués dans le cycle du virus WN. Cette résolution a permis de distinguer 27 classes d'occupation du sol différentes, correspondant à des unités écologiques pertinentes pour décrire les habitats des acteurs du cycle.

Dans ces travaux, nous nous sommes essentiellement intéressés aux données environnementales d'occupation du sol et de structure du paysage. D'autres données environnementales pourraient être intéressantes à étudier dans le cadre de l'identification de facteurs de risque environnementaux pour la transmission du virus WN.

L'indice de végétation le plus utilisé et le plus connu en épidémiologie, appelé NDVI (*Normalized Difference Vegetation Index*) permet de mesurer l'abondance, la distribution spatiale et la dynamique de végétation. Cet indice est souvent couplé à des mesures de température et des données de réflectance de la surface terrestre pour modéliser des milieux favorables aux vecteurs de maladies, comme les tiques ou surtout les moustiques (Kalluri et

al. 2007). Il représente une variation du pourcentage de biomasse fraîche pour un intervalle de temps donné et exploite la différence forte de réflectance de la végétation entre les bandes spectrales rouges et proche infrarouge (Kalluri et al. 2007). Comme les dynamiques de végétation sont influencées directement par les variations météorologiques, il existe une corrélation forte entre le NDVI et les variables météorologiques (température, précipitations). Cet indice mesure surtout les variations d'activité chlorophyllienne et son pic est atteint au printemps. Le NDVI peut être calculé à partir d'images Landsat ou MODIS par exemple, gratuites, de résolution spatiale de 250 m et de résolution temporelle de 16 jours. Cet indice présente donc plusieurs intérêts majeurs : il est facile à obtenir et à calculer, généralisable et plus dynamique que des données d'occupation du sol puisqu'actualisé deux fois par mois.

Il est utile pour caractériser des sites où les conditions environnementales sont réunies pour permettre la survie et surtout le développement des populations de moustiques, comme les vecteurs du virus WN. Cet indice a été utilisé pour identifier la distribution spatiale de populations de moustiques vecteurs de la maladie de West Nile en milieu urbain dans le Nord-est des Etats-Unis (Brown et al. 2008). D'autre part Ward a tenté de déterminer si cet indice était corrélé à l'émergence de cas cliniques équine en 2000 en Indiana (Ward et al. 2005). Les résultats n'ont pas été concluants car la zone étudiée était fortement agricole et les variations importantes de couverture végétale dues aux activités agricoles ont probablement trop perturbé les mesures du NDVI au moment de l'émergence des cas. Une deuxième étude de cet auteur, cette fois sur l'émergence de cas équine au Texas de 2002 à 2004, a montré que le NDVI permet de décrire, voire de prédire correctement la saisonnalité de la maladie de WN chez le cheval (Ward 2009). Cette étude illustre également la difficulté de généralisation d'une méthode d'utilisation du NDVI. En fonction de la zone étudiée et donc des conditions environnementales et des espèces de moustiques impliquées, une durée différente d'estimation du NDVI avant la survenue des cas devra être choisie pour prédire correctement une épizootie (Ward 2009). L'étude de l'utilisation de cet indice de végétation dans le cadre d'une prédiction de conditions favorables à la transmission du virus WN en France pourrait être envisagée, en adaptant la méthode aux conditions locales.

Les données de démoustication, comme par exemple l'application d'un traitement insecticide global, ciblé sur les *Culex* ou ciblé sur d'autres espèces de moustiques dans la zone d'étude paraissent très importantes à inclure dans les variables environnementales à prendre en compte pour étudier la circulation du virus WN. Ces traitements ont bien sûr un effet immédiat sur les populations de moustiques présentes dans la zone étudiée, mais il serait

intéressant d'évaluer s'il existe un effet à plus long terme, pouvant influencer la transmission du virus WN dans la région étudiée. Ponçon et al en 2007 ont suivi l'historique des traitements phytosanitaires appliqués dans les rizières de Camargue pendant 60 ans et ont montré une corrélation forte entre ces traitements et l'évolution des populations de *Culex modestus* et *Anopheles hyrcanus*. L'objectif serait d'étudier les effets de la démoustication dans une zone d'étude, mais sur une échelle de temps plus courte. La limite majeure à ce travail est que les données sont détenues par l'EID (Entente Interdépartementale de Démoustication) et qu'il est nécessaire d'obtenir une autorisation après une demande bien argumentée pour accéder aux informations.

Analyse statistique

De façon plus ou moins implicite à toutes les techniques statistiques traditionnelles, deux postulats de base doivent être respectés : toutes les observations sont indépendantes et distribuées de façon identique. Or ces postulats sont faux la plupart du temps quand il s'agit de données spatiales. En effet dans l'espace, les éléments proches les uns des autres ont beaucoup plus de chances de se ressembler que ceux qui en sont éloignés (Thompson et al. 2000) ou en d'autres termes tout élément est lié à tout autre et ceux qui sont proches sont plus liés que ceux situés à distance (Moore et al. 1999). Ces données sont donc spatialement corrélées. Ce phénomène existe dans toute étude faisant intervenir la localisation de données dans l'espace et des méthodes statistiques spécifiques ont du être développées pour le prendre en compte. Si cette autocorrélation spatiale n'est pas prise en compte par une des méthodes possibles, alors le chercheur prend le risque de commettre des erreurs d'estimation des paramètres de régression par exemple et de conclure faussement à la signification d'une variable au détriment d'une autre. Depuis le début des années 1990, la grande majorité des études environnementales sur les maladies vectorielles évalue l'effet de ce phénomène sur les données par différentes approches (Thompson et al. 2000). La détection de l'autocorrélation spatiale est aussi une méthode pour identifier des clusters de cas d'une maladie dans l'espace (Ward et al. 2000). La prise en compte de cette corrélation spatiale est très complexe à mettre en œuvre en fonction du type de données analysées et elle fait l'objet d'un vaste champ de recherche en géostatistiques.

Le test le plus connu et simple d'application mais aussi le plus limité est le test I de Moran, dont l'hypothèse nulle est que les observations sont distribuées au hasard. Ce test a été utilisé

dans l'article sur la circulation du virus WN et l'étude du paysage et de sa structure dans le bassin méditerranéen français (Pradier et al. 2008).

D'autres approches permettant de prendre en compte la corrélation spatiale des données existent et ont été utilisées dans l'article précédemment cité, comme le maillage de la zone d'étude et dans le deuxième article sur l'influence de l'eau sur la circulation du virus WN en Camargue, en intégrant les coordonnées géographiques X et Y dans le modèle statistique.

Pour identifier des facteurs de risque environnementaux associés à la transmission du virus WN au cheval, deux méthodes de travail ont été employées dans les travaux présentés.

Une première méthode consiste à utiliser des données surfaciques, comme des mailles et à agréger les données sérologiques équines à l'intérieur de celles-ci. Cette option a été choisie dans le premier article (Pradier et al. 2008). La difficulté principale de cette méthode réside dans le classement des mailles en « positives » (il existe une circulation significative du virus dans la maille) et « négatives » (pas de circulation virale). Ce classement dépend essentiellement du nombre de chevaux prélevés dans chaque maille, mais aussi du nombre de chevaux présents dans la maille, pour pouvoir calculer un pourcentage d'échantillonnage. Il faudrait donc avoir une idée précise de la densité de population équine dans la zone d'étude. Or nous avons exposé dans la première partie les limites de cette connaissance. Nous avons donc du trouver une solution pour trancher sans cette information.

Une deuxième méthode, plus largement utilisée dans les études des maladies vectorielles, est l'emploi de données ponctuelles (les écuries ou les chevaux dans notre cas) et l'étude des variables environnementales autour de ces points dans des cercles ou « *buffers* » de rayons déterminés. C'est cette méthode qui a été utilisée dans le deuxième article. L'avantage des données ponctuelles, comme les écuries ou les chevaux, est de pouvoir prendre en compte d'autres facteurs que l'environnement, comme des facteurs liés à l'écurie ou même au cheval en lui-même (âge, sexe, activité...).

B. Résultats acquis

Paysage, biodiversité et effet de dilution

Dans le premier article, nous avons montré qu'il existe une association significative entre la circulation enzootique du virus WN en France et une hétérogénéité du paysage pouvant permettre l'établissement de multiples contacts entre les vecteurs et les hôtes. L'indice de paysage le plus significatif dans cette étude, l'indice d'imbrication et de juxtaposition (IJI) mesure objectivement le degré d'imbrication des différentes classes d'occupation du sol. Il est maximal quand chaque classe d'occupation du sol présente dans un paysage a une frontière commune avec toutes les autres (McGarigal et al. 2002). Il quantifie des variations de biodiversité ou d'abondance d'espèces, mais aussi les contacts qu'elles peuvent avoir entre elles. L'autre variable très significative dans le modèle final de cet article est une des classes d'occupation du sol CLC : les zones agricoles hétérogènes. Cette classe correspond à de petites parcelles agricoles interrompues par de la végétation naturelle et des espèces forestières. La corrélation forte existant entre une circulation enzootique du virus WN et ces deux variables environnementales va dans le sens d'une configuration spatiale complexe du paysage, indicatrice d'une biodiversité importante et propice au maintien de la transmission du virus West Nile. Un résultat du troisième article sur l'évaluation des mécanismes de transmission du virus WN en Camargue va également dans ce sens. En effet dans cet article, l'impact potentiel d'un effet de dilution est évalué. Etant donné que les moustiques vecteurs ne peuvent prendre qu'un nombre limité de repas sanguins dans leur vie, plus le nombre de repas pris sur des espèces d'hôtes non compétentes pour amplifier le virus WN augmente, plus le taux d'infection dans la population de moustiques et donc le risque de transmission du virus diminue (Ezenwa et al. 2006). Cet effet de dilution existe dans un contexte de diversité biologique marquée, à condition que la plupart des espèces présentes soient non compétentes pour le virus. Il apparaît clairement dans le troisième article qu'il n'y aurait pas d'effet de dilution en Camargue, contrairement aux Etats-Unis.

D'après nos études, dans le Sud de la France, les zones favorables à la circulation enzootique du virus West Nile sont des milieux dans lesquels l'hétérogénéité du paysage est importante, signe d'une biodiversité riche, sans qu'un effet de dilution n'ait d'impact sur la transmission du virus entre les hôtes, probablement parce que de nombreuses espèces d'oiseaux sont compétentes pour le virus dans cette région.

Identification des vecteurs du virus WN en Camargue

Les deux derniers articles vont dans le sens d'une implication majeure de *C. modestus* comme vecteur principal du virus WN en Camargue. Dans le deuxième article sur l'influence de l'eau sur la circulation enzootique du virus WN en Camargue, plusieurs tailles de zones tampons autour des écuries ont été testées et la taille sélectionnée dans le meilleur modèle était de 2 km. Cette petite distance autour des écuries oriente vers un vecteur ayant une distance de vol courte, comme les *Culex*. De plus la surface moyenne en végétation inondée, comme les rizières ou les roselières était positivement corrélée au risque de circulation enzootique du virus WN dans les écuries. Ce facteur de risque environnemental oriente vers l'implication de *C. modestus* dans la transmission du virus WN, puisque c'est l'espèce de moustique la plus abondante dans ce type de milieux. Dans le troisième article sur les mécanismes de transmission du virus WN en Camargue, *C. modestus* est identifié comme le vecteur principal d'amplification du virus WN en Camargue. Ces deux études confirment les résultats récents obtenus par Balenghien en 2006 sur la distribution, les préférences trophiques et la compétence vectorielle de *C. modestus* en Camargue (Balenghien 2006, Balenghien et al. 2006, Balenghien et al. 2007, Balenghien et al. 2008). Très compétent pour le virus WN, très abondant en zones humides (roselières), se dispersant peu en terrain découvert, *C. modestus* peut certainement établir des cycles enzootiques très efficaces avec les oiseaux présents dans ces milieux, piquer agressivement les hôtes accidentels (homme et cheval) qui pénètrent ces gîtes et leur transmettre le virus.

Dans le troisième article, après validation des scénarios d'introduction-amplification-émergence simulés grâce aux données sérologiques équinnes, il apparaît que la transmission du virus au cheval en Camargue serait assurée à la fois par *C. modestus*, mais aussi par *C. pipiens*. Ce résultat permet d'expliquer plus facilement comment une épizootie de WN a pu avoir lieu en zone sèche en 2000 en Camargue, zone où *C. modestus* est peu présent. D'autre part ce résultat corrobore les hypothèses de Balenghien en 2006 sur *C. pipiens* (Balenghien 2006). Très abondant en zone humide, mais moins compétent que *C. modestus*, ce moustique pourrait jouer un rôle secondaire ou prendre le relais de *C. modestus*. Par contre dominant en zone sèche, dans des gîtes artificiels, il pourrait maintenir un cycle, si la densité d'Oiseaux est forte et transmettre également à l'homme et au cheval, du fait qu'il n'est pas strictement ornithophile, dans les zones où la densité de populations équinnes et humaines est plus grande.

Hypothèses sur les mécanismes de persistance du virus WN en Camargue

A l'heure actuelle, les auteurs proposent plusieurs hypothèses de persistance du virus WN d'une année sur l'autre dans une zone géographique. Notre troisième article peut permettre de considérer comme mineures certaines de ces hypothèses en Camargue, comme la survie pendant l'hiver du virus dans des femelles moustiques infectées. Aux Etats-Unis, le virus WN a été plusieurs fois isolé sur des femelles *C. pipiens* ayant passé l'hiver, probablement infectées par transmission verticale (Nasci et al. 2001, Farajollahi et al. 2005, Reisen et al. 2006) ou après de petits repas sanguins en prédiapause à l'automne. Au printemps, elles sortiraient de diapause et pourraient immédiatement transmettre le virus. Cette hypothèse a été testée dans notre étude à la fois sur *Culex pipiens*, mais aussi sur *C. modestus* et a été statistiquement rejetée au profit de l'hypothèse d'introduction par les Oiseaux migrateurs. Par contre d'après nos résultats, il n'a pas été possible de trancher entre une introduction par l'Afrique sub-saharienne et le Maghreb au printemps et une introduction par l'Europe de l'Est et du Nord en été. Il est probable que les deux mécanismes co-existent en Camargue. Une autre hypothèse de persistance du virus est proposée dans la littérature (Reisen et al. 2007a) : une infection chronique des Oiseaux avec persistance du virus WN dans certains organes, comme les reins, pendant l'hiver chez des espèces aviaires ne succombant pas à l'infection. Cette hypothèse n'a pas pu être testée dans notre étude. Enfin le virus WN pourrait survivre à l'hiver par transmission vectorielle continue. Ce mécanisme est démontré aux chaudes latitudes, zones où des oiseaux et moustiques ont été trouvés infectés toute l'année (Tesh et al. 2004) et une répllication du virus a lieu même l'hiver chez le moustique *C. quinquefasciatus* qui est capable de transmettre toute l'année. Ce phénomène a également été démontré au Texas et en Californie (Reisen et al. 2007a). Il est peu probable que ce mécanisme existe en Camargue, du fait des conditions météorologiques très dures en hiver dans cette région.

Hypothèses sur les mécanismes d'amplification du virus WN en Camargue

Deux mécanismes sont proposés dans la littérature pour l'amplification du virus WN (Reisen et al. 2007a). Le premier est l'existence de virémies très élevées développées par certaines espèces d'oiseaux, comme les Corvidés, permettant la participation de vecteurs peu compétents, comme *C. pipiens* dans l'amplification. Ce mécanisme a été testé dans notre étude et n'a pas été retenu. D'après nos résultats, de nombreuses espèces d'oiseaux, voire

toutes les espèces étudiées pourraient contribuer à l'amplification du virus WN en Camargue. Ce résultat va dans le sens du deuxième mécanisme d'amplification proposé dans la littérature qui est une participation de vecteurs très compétents comme *C. modestus* et une transmission à des espèces d'oiseaux moins compétentes (Reisen et al. 2007a).

Facteurs de risque individuels vis-à-vis de l'infection du cheval par le virus WN

Nous avons considéré que le cheval, choisi comme indicateur de la circulation enzootique du virus WN dans nos études, a des caractéristiques propres qui peuvent faire varier la probabilité de contact de cet indicateur avec le virus WN. Dans le deuxième article de ce travail de thèse, nous avons tenté d'analyser l'influence de certains de ces facteurs de risque individuels, une fois les facteurs de risque environnementaux pris en compte. Dans les études antérieures dans cette région, ces facteurs de risque individuels ont déjà été étudiés, mais simultanément à l'étude des facteurs de risque environnementaux. Durand et al en 2002 ont évalué trois facteurs : la race, l'âge et le sexe. Le seul facteur significatif était la race, la race Camargue étant plus à risque (Durand et al. 2002). Une autre étude dans la même région n'a pas pu établir de lien significatif entre les caractéristiques individuelles du cheval (race, âge, sexe et activité) et la circulation enzootique du virus WN (Leblond et al. 2005). Dans notre étude, certaines caractéristiques individuelles du cheval (l'âge, l'activité et la race) ont été identifiées comme des facteurs de risque, les facteurs de risque environnementaux ayant déjà été pris en compte. Une naissance après 2004 était négativement corrélée au risque, ce qui est en accord avec l'absence d'émergence de cas cliniques équins rapportées dans la région d'étude depuis septembre 2004. Ce facteur serait donc le témoin d'une absence de circulation intense du virus WN depuis cette date. L'activité des chevaux utilisés pour l'élevage du taureau serait plus à risque, contrairement à une activité dans un centre équestre. La race Camargue serait un facteur protecteur vis-à-vis de l'infection par le virus WN dans la région d'étude, les facteurs de risque environnementaux ayant été pris en compte.

Ces facteurs de risque individuels vont pouvoir influencer sur deux aspects de la circulation enzootique du virus WN :

- la probabilité que le cheval soit piqué par un vecteur infecté,
- la probabilité que le cheval développe une infection, puis une maladie clinique, une fois piqué par le vecteur.

Le premier aspect nous paraît plutôt lié à l'activité du cheval, signe d'un certain mode de vie (logement, environnement de travail, traitements antiparasitaires appliqués sur le cheval ou dans l'environnement...). Mais il pourrait être lié également à la race, par l'intermédiaire de la couleur de la robe (ex : robe grise exclusivement pour le cheval Camargue par exemple). En effet, il est connu que les chevaux à robes claires sont moins piqués par les moustiques que les chevaux à robes foncées.

Le deuxième aspect nous paraît plutôt lié à des facteurs génétiques de certaines races, pouvant conférer une résistance à l'infection par le virus WN ou au contraire une plus grande sensibilité. Chez l'homme, une base génétique a été trouvée et est encore explorée sur la sensibilité à l'infection par le virus WN et au fait de développer des signes cliniques graves, voire létaux (Diamond et al. 2006, Lim et al. 2008, Mashimo et al. 2008). Il est envisageable qu'une prédisposition génétique existe également chez le cheval, en particulier dans la race Camargue, très anciennement établie dans une région où le virus circule depuis longtemps. Cette piste de recherche a commencé à être explorée sur les chevaux de notre base de données (Sabakova et al. 2008).

C. Perspectives à court et moyen terme

De nombreuses perspectives sont envisageables à la lumière des études entreprises jusque là.

Le modèle statistique présenté dans le premier article sur l'étude du paysage et la circulation enzootique du virus WN devrait être validé avec d'autres données que celles ayant servi à son élaboration. Les données sérologiques collectées en 2007 et 2008 pourraient être utilisées pour tester le pourcentage de bonne classification par le modèle. D'autre part, ce modèle pourrait être appliqué à d'autres zones où le virus WN circule et pour lesquelles il existe déjà des données sérologiques chez les chevaux et des données CLC. La Roumanie, l'Italie et le Maroc répondent à ces critères. Enfin d'autres tailles et d'autres formes de cellules que celles que nous avons choisies (carrés de 5 km de côté) pourraient être testées pour tenter d'améliorer le modèle.

Une carte de risque reste à construire grâce au modèle statistique du deuxième article sur l'influence de l'eau sur la circulation du virus WN en Camargue. Cette carte pourrait être superposée à des cartes de distribution des vecteurs ou des réservoirs construites grâce aux données du troisième article sur les mécanismes de transmission du virus WN. Cette phase servirait de validation à ce modèle. En matière de validation externe, ce modèle pourrait être

appliqué sur la zone d'étude varoise pour laquelle des données sérologiques chez les chevaux sont déjà disponibles. Une validation croisée pourrait également être envisagée avec les données sérologiques de 2004 en Camargue.

Une autre étude sur le lien entre la circulation du virus WN chez le cheval et les indices de paysage (en particulier des indices de biodiversité) pourrait être conduite en utilisant les données sérologiques équinées collectées en 2007-2008 et les données CLC mises à jour en 2006, gratuites et de meilleure résolution spatiale (20 m). D'autre part, la carte d'occupation du sol utilisée dans le troisième article sur les mécanismes de transmission du virus WN, issue d'images satellitales Landsat (résolution spatiale de 30 m), pourrait servir de base de calcul des indices de paysage. Ces indices sont fortement influencés par la résolution spatiale des données d'occupation du sol. Il serait utile d'approfondir l'analyse dans ce sens. Enfin une étude des facteurs de risque environnementaux pourrait être conduite selon la même méthode que les précédentes, mais en utilisant des images satellitales de plus grande résolution, comme les images Spot (10 m).

L'approche développée dans le troisième article sur les mécanismes de transmission du virus WN en Camargue pourrait être appliquée dans d'autres contextes, d'autres maladies multi-hôtes ou d'autres zones d'étude.

Il serait intéressant pour toute étude épidémiologique ultérieure dans l'espèce équine de mieux connaître la population équine générale en France et en particulier pouvoir avoir une idée précise de sa distribution spatiale, au minimum à l'échelle de la commune. Des efforts dans ce sens doivent être poursuivis par tous les acteurs de la filière équine. Les mêmes difficultés et besoins ont d'ailleurs récemment été exposés par nos confrères anglais (Robin et al. 2010).

Grâce à l'échantillon conséquent de données sérologiques collectées par notre équipe depuis 2001, il serait également possible de s'intéresser à la stabilité temporelle de la transmission du virus WN en Camargue, en construisant des cartes de prévalence par classes d'âge.

Enfin une étude, en marge de cette thèse, est en cours actuellement au sein du laboratoire de Virologie de Maisons-Alfort. Elle porte sur la description de la cinétique des anticorps dirigés contre le virus WN chez le cheval après infection naturelle et vaccination. Les prélèvements utilisés sont les sérums de chevaux séropositifs en IgG issus des enquêtes sérologiques entreprises en Camargue depuis 2000. Une collecte de sérums a été effectuée également en 2010 sur certains chevaux qu'il était intéressant de suivre. Cette étude fait

l'objet d'une thèse d'exercice vétérinaire de l'étudiant Nicolas Dauphin. Ce travail est dans la continuité d'une étude débutée par le Pr Agnès Leblond (Bicout et al. 2003).

IV. CONCLUSION GENERALE

Ce travail de thèse avait pour objectif d'évaluer le risque de circulation enzootique du virus WN en Camargue. Il a permis d'identifier certains facteurs de risque environnementaux, comme des classes d'occupation du sol (zones agricoles hétérogènes, végétation inondée) ou des indices de paysage (Indice d'Imbrication et de Juxtaposition), conduisant à l'élaboration de cartes de risque pour cette circulation. D'autre part ce travail a permis de renforcer les connaissances sur les mécanismes de transmission du virus WN en Camargue, notamment en ce qui concerne les vecteurs. Ces résultats pourront permettre de mieux cibler la surveillance de cette maladie en France et d'appliquer des stratégies de contrôle plus adaptées à la situation locale (démoustication des zones à risque, vaccination éventuelle des chevaux à risque par exemple).

Le grand volet de l'étude de l'émergence de cas cliniques de WN chez le cheval reste à étudier en France. Après avoir identifié et caractérisé les zones de circulation enzootique du virus WN chez le cheval, les zones et les périodes à risque d'émergence de cas cliniques équin doivent être étudiées. Pour cet autre volet de l'analyse, le recueil de cas cliniques équin est bien sûr fondamental. Il existe depuis 1999 un réseau d'épidémiologie-surveillance des pathologies équin (RESPE) en France, doté d'un sous-réseau de surveillance des affections neurologiques (Syndrome Nerveux) (Site Internet consultable à l'adresse : <http://www.respe.net>). Ce sous-réseau se base sur une approche de surveillance syndromique (Leblond et al. 2007a) et l'un de ses rôles est d'être capable de détecter le plus précocement possible une émergence de cas cliniques équin de WN en France. L'évaluation de ce réseau est actuellement en cours et devrait permettre de déterminer s'il répond bien aux critères fondamentaux d'un réseau d'épidémiologie-surveillance (sensibilité, spécificité, acceptabilité...). Il ne faut pas oublier qu'une surveillance passive repose sur une déclaration des cas suspects par les vétérinaires sentinelles et les performances du réseau dépendent de la sensibilisation de ces vétérinaires et de leur activité. Or il est clair que dans notre région d'étude, ces déclarations sont minoritaires du fait de la perte de confiance des propriétaires de chevaux et des vétérinaires envers les autorités sanitaires depuis l'épizootie de 2000. Les modifications réglementaires adoptées depuis 2004, qui ont allégé les mesures prises lors d'une déclaration de cas équin de WN, notamment sur les restrictions de mouvements de chevaux, devraient contribuer à améliorer la situation.

Pour l'analyse de l'émergence de cas cliniques équin de WN dans le sud de la France, il faudra comparer des années d'émergence avec des années témoins. Des données météorologiques seront certainement pertinentes à utiliser, car elles traduiront les variations de croissance de populations de moustiques vecteurs. Des données de température et de précipitations pourraient être collectées grâce aux mesures des stations météorologiques de la zone d'étude, pendant les périodes d'intérêt. Mais cette méthode est longue car il faut traiter un grand nombre de données et l'extrapolation à toute une zone à partir d'un petit nombre de stations météorologiques est toujours discutable. Une autre méthode consisterait à utiliser la télédétection pour quantifier les variations de l'activité chlorophyllienne, indicateur indirect des variations météorologiques. Un indice de végétation, comme le NDVI, pourrait être un paramètre intéressant à exploiter dans cet objectif, puisque il existe une corrélation forte entre cet indice et les variables météorologiques.

Historiquement l'étude et la surveillance des maladies chez les animaux et chez l'Homme étaient séparées. Aujourd'hui, avec l'approche « One Health, One Medecine », il est de notoriété publique qu'il serait dangereux et surtout inefficace d'ignorer les connexions existant dans les systèmes biologiques et qu'il vaut bien mieux tenter de rassembler les efforts des intervenants (Pfeiffer 2010). L'étude des facteurs de risque de la circulation du virus WN chez le cheval peut également servir à protéger la population humaine.

L'utilisation d'outils sophistiqués, comme la télédétection et les SIG, n'exonère pas le chercheur à prendre en compte des facteurs difficilement quantifiables que sont les changements ou les différences de comportements humains ou animaux qui peuvent influencer le contact avec le vecteur d'une maladie infectieuse, mais aussi les habitudes et traditions régionales très ancrées dans une région comme la Camargue. Par exemple, pour l'homme et la maladie de WN, il ne faudra pas négliger le temps passé à l'extérieur, le type d'habitations occupées, l'utilisation de moustiquaires ou de répulsifs, l'accès plus ou moins facile à un centre médical...Tous ces facteurs individuels sont influencés par les choix individuels, mais surtout par l'appartenance à une certaine catégorie socio-économique. Cette notion est d'ailleurs également valable pour la gestion des animaux par les propriétaires. L'épidémiologiste, toujours à la recherche de mesures de paramètres fiables et objectifs ne devra pas négliger ces facteurs s'il veut correctement comprendre et prévenir une maladie. Pour approcher au mieux ces caractéristiques individuelles, l'enquête de terrain restera toujours un outil essentiel.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Allan B. F., Langerhans R. B., Ryberg W. A., Landesman W. J., Griffin N. W., Katz R. S., Oberle B. J., Schutzenhofer M. R., Smyth K. N., de St Maurice A., Clark L., Crooks K. R., Hernandez D. E., McLean R. G., Ostfeld R. S. et Chase J. M.** (2009) Ecological correlates of risk and incidence of West Nile virus in the United States. *Oecologia*, **158** (4): 699-708.
- Astier S.** (2004) Infection des Equidés par le virus West Nile : étude environnementale et constitution d'un groupe de chevaux sentinelles pour l'étude des mécanismes de transmission. *Thèse de doctorat vétérinaire*, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon: 215 p.
- Bailey D., Billeter R., Aviron S., Schweiger O. et Herzog F.** (2007) The influence of thematic resolution on metric selection for biodiversity monitoring in agricultural landscapes. *Landscape Ecol*, **22** (3): 461-473.
- Balanca G., Gaidet N., Savini G., Vollot B., Foucart A., Reiter P., Boutonnier A., Lelli R. et Monicat F.** (2009) Low West Nile virus circulation in wild birds in an area of recurring outbreaks in Southern France. *Vector Borne Zoonotic Dis*, **9** (6): 737-741.
- Balaÿ D. et Balaÿ F.** (2007) Il était une fois...l'île de Camargue. Editions des Falaises, Rouen: 111 p.
- Balenghien T.** (2006) De l'identification des vecteurs du virus West Nile à la modélisation du risque d'infection dans le sud de la France. *Thèse de doctorat*, Université des Sciences des Technologies et de la Santé, Grenoble: 223 p.
- Balenghien T., Fouque F., Sabatier P. et Bicout D. J.** (2006) Horse-, bird-, and human-seeking behavior and seasonal abundance of mosquitoes in a West Nile virus focus of southern France. *J Med Entomol*, **43** (5): 936-946.
- Balenghien T., Vazeille M., Reiter P., Schaffner F., Zeller H. et Bicout D. J.** (2007) Evidence of laboratory vector competence of *Culex modestus* for West Nile virus. *J Am Mosq Control Assoc*, **23** (2): 233-236.
- Balenghien T., Vazeille M., Grandadam M., Schaffner F., Zeller H., Reiter P., Sabatier P., Fouque F. et Bicout D. J.** (2008) Vector competence of some French *Culex* and *Aedes* mosquitoes for West Nile virus. *Vector Borne Zoonotic Dis*, **8** (5): 589-595.
- Bicout D., Leblond A., Heng M. A., Durand B., Zientara S., Durand J. P. et Sabatier P.** (2003) Analysis of seroprevalence in horses in an endemic area of West Nile disease, Camargue, France. *Xth Congress of the International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics, Vina del Mar, Chili, 17-21 Novembre 2003*.
- Braut A. C.** (2009) Changing patterns of West Nile virus transmission: altered vector competence and host susceptibility. *Vet Res*, **40** (2): 43.
- Brown H., Duik-Wasser M., Andreadis T. et Fish D.** (2008) Remotely-sensed vegetation indices identify mosquito clusters of West Nile virus vectors in an urban landscape in the northeastern United States. *Vector Borne Zoonotic Dis*, **8** (2): 197-206.

- 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. et Mitchell C. J.** (2002) Experimental infection of horses with West Nile virus. *Emerg Infect Dis*, **8** (4): 380-386.
- Campbell G. L., Marfin A. A., Lanciotti R. S. et Gubler D. J.** (2002) West Nile virus. *Lancet Infect Dis*, **2** (9): 519-529.
- Cardinale E.** (1994) Elevage du taureau et du cheval en Camargue. *Thèse de doctorat vétérinaire*, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse: 146 p.
- Castillo-Olivares J. et Wood J.** (2004) West Nile virus infection of horses. *Vet Res*, **35** (4): 467-483.
- CDC** (2002a) Update: investigations of West Nile virus infections in recipients of organ transplantation and blood transfusion-Michigan, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, **51** (39): 879.
- CDC** (2002b) Intrauterine West Nile virus infection--New York, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, **51** (50): 1135-1136.
- CDC** (2002c) Possible West Nile virus transmission to an infant through breast-feeding-Michigan, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, **51** (39): 877-878.
- CDC** (2002d) Laboratory-acquired West Nile virus infections--United States, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, **51** (50): 1133-1135.
- CDC** (2003) West Nile virus infection among turkey breeder farm workers--Wisconsin, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, **52** (42): 1017-1019.
- CDC** (2004) Possible dialysis-related West Nile virus transmission--Georgia, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, **53** (32): 738-739.
- Cernescu C., Nedelcu N. I., Tardei G., Ruta S. et Tsai T. F.** (2000) Continued transmission of West Nile virus to humans in southeastern Romania, 1997-1998. *J Infect Dis*, **181** (2): 710-712.
- Couissinier-Paris P.** (2006) West Nile virus in Europe and Africa: still minor pathogen, or potential threat to public health? *Bull Soc Pathol Exot*, **99** (5): 348-354.
- Dauphin G., Zientara S., Zeller H. et Murgue B.** (2004) West Nile: worldwide current situation in animals and humans. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **27** (5): 343-355.
- Dauphin G. et Zientara S.** (2007) West Nile virus: recent trends in diagnosis and vaccine development. *Vaccine*, **25** (30): 5563-5576.
- Davidson A. H., Traub-Dargatz J. L., Rodeheaver R. M., Ostlund E. N., Pedersen D. D., Moorhead R. G., Stricklin J. B., Dewell R. D., Roach S. D., Long R. E., Albers S. J., Callan R. J. et Salman M. D.** (2005) Immunologic responses to West Nile virus in vaccinated and clinically affected horses. *J Am Vet Med Assoc*, **226** (2): 240-245.
- Del Giudice P., Schuffenecker I., Vandenbos F., Counillon E. et Zeller H.** (2004) Human West Nile virus, France. *Emerg Infect Dis*, **10** (10): 1885-1886.

- Diamond M. S. et Klein R. S.** (2006) A genetic basis for human susceptibility to West Nile virus. *Trends Microbiol*, **14** (7): 287-289.
- Duquenne F., Botton S., Peyret F., Bétaille D. et Willis P.** (2005) GPS : localisation et navigation par satellites. Seconde édition revue et augmentée. Hermès Science Lavoisier, Paris: 330 p.
- Durand B., Chevalier V., Pouillot R., Labie J., Marendat I., Murgue B., Zeller H. et Zientara S.** (2002) West Nile virus outbreak in horses, southern France, 2000: results of a serosurvey. *Emerg Infect Dis*, **8** (8): 777-782.
- Durand B., Dauphin G., Zeller H., Labie J., Schuffenecker I., Murri S., Moutou F. et Zientara S.** (2005) Serosurvey for West Nile virus in horses in southern France. *Vet Rec*, **157** (22): 711-713.
- Durand B., Balanca G., Baldet T. et Chevalier V.** (2010) A metapopulation model to simulate West Nile virus circulation in Western Africa, Southern Europe and the Mediterranean basin. *Vet Res*, **41** (3): 32.
- Eloit M.** (2006) West Nile virus, horses - France: OIE. *Promed*: <http://www.promedmail.org> See archive number : 20061010.20062903.
- Ezenwa V. O., Godsey M. S., King R. J. et Guptill S. C.** (2006) Avian diversity and West Nile virus: testing associations between biodiversity and infectious disease risk. *Proc Biol Sci*, **273** (1582): 109-117.
- Farajollahi A., Crans W. J., Bryant P., Wolf B., Burkhalter K. L., Godsey M. S., Aspen S. E. et Nasci R. S.** (2005) Detection of West Nile viral RNA from an overwintering pool of *Culex pipens pipiens* (Diptera: Culicidae) in New Jersey, 2003. *J Med Entomol*, **42** (3): 490-494.
- Fonseca K., Prince G. D., Bratvold J., Fox J. D., Pybus M., Preksaitis J. K. et Tilley P.** (2005) West Nile virus infection and conjunctival exposure. *Emerg Infect Dis*, **11** (10): 1648-1649.
- Gerhardt R.** (2006) West Nile virus in the United States (1999-2005). *J Am Anim Hosp Assoc*, **42** (3): 170-177.
- Gubler D. J.** (2007) The continuing spread of West Nile virus in the western hemisphere. *Clin Infect Dis*, **45** (8): 1039-1046.
- Guis H., Tran A., de La Rocque S., Baldet T., Gerbier G., Barragué B., Biteau-Coroller F., Roger F., Viel J. F. et Mauny F.** (2007) Use of high spatial resolution satellite imagery to characterize landscapes at risk for bluetongue. *Vet Res*, **38** (5): 669-683.
- Gyure K. A.** (2009) West Nile virus infections. *J Neuropathol Exp Neurol*, **68** (10): 1053-1060.
- Hannoun C., Panthier R., Mouchet J. et Eouzan J. P.** (1964) Isolement en France du virus West Nile à partir de malades et du vecteur *Culex Modestus* Ficalbi. *C R Hebd Seances Acad Sci*, **259**: 4170-4172.

- Hars J., Auge P., de Visscher M. N., Keck N., Murgue B. et Zeller H.** An epidemic of West Nile fever in the south of France. Results of an epidemiologic survey on wild birds. In: Wildlife Disease Association Annual Conference, Kwa Maritane, South Africa, 22-27 Juillet 2001.
- Hars J., Augé P., Pradel J., Mortamais M., Chavernac D., Balanca G., Zientara S., Schuffenecker I. et Zeller H.** Surveillance of West Nile Virus in the avifauna of Southern France. In: 8th European Association of Avian Veterinarians Conference, Arles, France, 24-30 Avril 2005.
- Hayes C. G.** (2001) West Nile virus: Uganda, 1937, to New York City, 1999. *Ann N Y Acad Sci*, **951**: 25-37.
- Hinckley A. F., O'Leary D. R. et Hayes E. B.** (2007) Transmission of West Nile virus through human breast milk seems to be rare. *Pediatrics*, **119** (3): e666-671.
- Hoffmann L., Mouchet J., Rageau J., Hannoun C., Joubert L., Oudar J. et Beytout D.** (1968) Epidémiologie du virus : étude d'un foyer en Camargue. II. Esquisse du milieu physique, biologique et humain. *Ann Inst Pasteur (Paris)*, **114** (4): 521-538.
- Hubalek Z. et Halouzka J.** (1999) West Nile fever--a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis*, **5** (5): 643-650.
- Hurlbut H. S., Rizk F., Taylor R. M. et Work T. H.** (1956) A study of the ecology of West Nile virus in Egypt. *Am J Trop Med Hyg*, **5** (4): 579-620.
- Janbon M., Harant H. et J. C.** (1942) Sur l'existence de la fièvre à phlébotomes dans le Languedoc méditerranéen. *Bull Acad Med*, **126**: 236-240.
- Joubert L. et Oudar J.** (1970a) Les zoonoses arbovirales, leur présence en France. II. La méningo-encéphalomyélite équine West Nile du Midi méditerranéen français. *Rev Med Vet*, **121** (3): 221-245.
- Joubert L., Oudar J., Hannoun C., Beytout D., Corniou B., Guillon J. C. et Panthier R.** (1970b) Epidémiologie du virus West Nile : étude d'un foyer en Camargue. IV. La méningo-encéphalomyélite du cheval. *Ann Inst Pasteur (Paris)*, **118** (2): 239-247.
- Joubert L., Oudar J., Hannoun C. et Chippaux M.** (1971) Reproduction expérimentale de la méningo-encéphalomyélite 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 Vet Fr*, **44** (3): 159-167.
- Joubert L. et Oudar J.** (1974) La méningoencéphalite à virus West Nile du cheval dans le midi Méditerranéen de la France. *Bull Soc Sci Vét et Méd comparée*, **76** (4): 255-259.
- Jourdain E., Gauthier-Clerc M., Bicout D. J. et Sabatier P.** (2007a) Bird migration routes and risk for pathogen dispersion into western Mediterranean wetlands. *Emerg Infect Dis*, **13** (3): 365-372.
- Jourdain E., Schuffenecker I., Korimbocus J., Reynard S., Murri S., Kayser Y., Gauthier-Clerc M., Sabatier P. et Zeller H. G.** (2007b) West Nile virus in wild resident birds, Southern France, 2004. *Vector Borne Zoonotic Dis*, **7** (3): 448-452.

- Jourdain E., Toussaint Y., Leblond A., Bicout D. J., Sabatier P. et Gauthier-Clerc M.** (2007c) 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*, **7** (1): 15-33.
- Jourdain E., Gauthier-Clerc M., Sabatier P., Grege O., Greenland T., Leblond A., Lafaye M. et Zeller H. G.** (2008) Magpies as hosts for West Nile virus, southern France. *Emerg Infect Dis*, **14** (1): 158-160.
- Kalluri S., Gilruth P., Rogers D. et Szczur M.** (2007) Surveillance of Arthropod Vector-Borne Infectious Diseases using Remote Sensing Techniques: a review. *PLoS Pathog*, **3** (10): e116.
- Kilpatrick A. M., Daszak P., Jones M. J., Marra P. P. et Kramer L. D.** (2006) Host heterogeneity dominates West Nile virus transmission. *Proc Biol Sci*, **273** (1599): 2327-2333.
- Komar N.** (2000) West Nile viral encephalitis. *Rev Sci Tech OIE*, **19** (1): 166-176.
- Kotton C. N.** (2007) Zoonoses in solid-organ and hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis*, **44** (6): 857-866.
- Kramer L. D., Li J. et Shi P. Y.** (2007) West Nile virus. *Lancet Neurol*, **6** (2): 171-181.
- Kramer L. D., Styer L. M. et Ebel G. D.** (2008) A global perspective on the epidemiology of West Nile virus. *Annu Rev Entomol*, **53**: 61-81.
- Leblond A., Zientara S., Chadoeuf J., Comby N., Heng M. A. et Sabatier P.** (2005) Prévalence de l'infection par le virus West Nile chez le cheval en Camargue en 2001. *Rev Med Vet*, **156** (2): 77-84.
- Leblond A., Hendriks P. et Sabatier P.** (2007a) West Nile virus outbreak detection using syndromic monitoring in horses. *Vector Borne Zoonotic Dis*, **7** (3): 403-410.
- Leblond A., Sandoz A., Lefebvre G., Zeller H. et Bicout D. J.** (2007b) Remote sensing based identification of environmental risk factors associated with West Nile disease in horses in Camargue, France. *Prev Vet Med*, **79** (1): 20-31.
- Lim J. K., Louie C. Y., Glaser C., Jean C., Johnson B., Johnson H., McDermott D. H. et Murphy P. M.** (2008) Genetic deficiency of chemokine receptor CCR5 is a strong risk factor for symptomatic West Nile virus infection: a meta-analysis of 4 cohorts in the US epidemic. *J Infect Dis*, **197** (2): 262-265.
- Liu A., Lee V., Galusha D., Slade M. D., Diuk-Wasser M., Andreadis T., Scotch M. et Rabinowitz P. M.** (2009a) Risk factors for human infection with West Nile Virus in Connecticut: a multi-year analysis. *Int J Health Geogr*, **8**: 67.
- Liu H. et Weng Q.** (2009b) An examination of the effect of landscape pattern, land surface temperature, and socioeconomic conditions on WNV dissemination in Chicago. *Environ Monit Assess*, **159** (1-4): 143-161.

- Mailles A., Dellamonica P., Zeller H., Durand J. P., Zientara S., Goffette R., Gloaguen C., Armengaud A., Schaffner F., Hars J., Chodorge E. et Barbat J.** (2003) Human and equine West Nile Infections in France, August-September 2003. *Euro Surveill weekly*, **7** (43): pii=2312.
- Mashimo T., Simon-Chazottes D. et Guenet J. L.** (2008) Innate resistance to flavivirus infections and the functions of 2'-5' oligoadenylate synthetases. *Curr Top Microbiol Immunol*, **321**: 85-100.
- McGarigal K., Cushman S. A., Neel M. C. et Ene E.** (2002) FRAGSTATS: Spatial Pattern Analysis Program for Categorical Maps. Computer software program produced by the authors at the University of Massachusetts, Amherst. Available at the following web site : <http://www.umass.edu/landeco/research/fragstats/fragstats.html>.
- Miller D. L., Mauel M. J., Baldwin C., Burtle G., Ingram D., Hines M. E., 2nd et Frazier K. S.** (2003) West Nile virus in farmed alligators. *Emerg Infect Dis*, **9** (7): 794-799.
- Moore D. A. et Carpenter T. E.** (1999) Spatial Analytical Methods and Geographic Information Systems: Use in Health research and Epidemiology. *Epidemiol Rev*, **21** (2): 143-161.
- Mostashari F., Kulldorff M., Hartman J. J., Miller J. R. et Kulasekera V.** (2003) Dead bird clusters as an early warning system for West Nile virus activity. *Emerg Infect Dis*, **9** (6): 641-646.
- Mouchet J., Rageau J., Laumond C., Hannoun C., Beytout D., Oudar J., Corniou B. et Chippaux A.** (1970) Epidémiologie du virus West Nile : étude d'un foyer en Camargue. V. Le vecteur : *Culex modestus* Ficalbi Diptera; Culicidae]. *Ann Inst Pasteur (Paris)*, **118** (6): 839-855.
- Murgue B., Murri S., Triki H., Deubel V. et Zeller H. G.** (2001a) West Nile in the Mediterranean basin: 1950-2000. *Ann N Y Acad Sci*, **951**: 117-126.
- Murgue B., Murri S., Zientara S., Durand B., Durand J. P. et Zeller H.** (2001b) West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years. *Emerg Infect Dis*, **7** (4): 692-696.
- 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. et Lanciotti R. S.** (2001) West Nile virus in overwintering *Culex* mosquitoes, New York City, 2000. *Emerg Infect Dis*, **7** (4): 742-744.
- Nemeth N., Young G., Ndaluka C., Bielefeldt-Ohmann H., Komar N. et Bowen R.** (2009) Persistent West Nile virus infection in the house sparrow (*Passer domesticus*). *Arch Virol*, **154** (5): 783-789.
- O'Leary D. R., Kuhn S., Kniss K. L., Hinckley A. F., Rasmussen S. A., Pape W. J., Kightlinger L. K., Beecham B. D., Miller T. K., Neitzel D. F., Michaels S. R., Campbell G. L., Lanciotti R. S. et Hayes E. B.** (2006) Birth outcomes following West Nile Virus infection of pregnant women in the United States: 2003-2004. *Pediatrics*, **117** (3): e537-545.
- Ostlund E. N., Andresen J. E. et Andresen M.** (2000) West Nile encephalitis. *Vet Clin North Am Equine Pract*, **16** (3): 427-441.
- Ostlund E. N., Crom R. L., Pedersen D. D., Johnson D. J., Williams W. O. et Schmitt B. J.** (2001) Equine West Nile encephalitis, United States. *Emerg Infect Dis*, **7** (4): 665-669.

- Oudar J., Joubert L., Lapras M. et Guillon J. C.** (1971) Reproduction expérimentale de la méningo-encéphalomyélite du cheval par l'arbovirus West Nile. II. Etude anatomo-clinique. *Bull Acad Vet Fr*, **44** (3): 147-158.
- Panthier R.** (1968) Epidémiologie du virus West Nile : étude d'un foyer en Camargue. I. Introduction. *Ann Inst Pasteur (Paris)*, **114** (4): 518-520.
- Panthier R., Hannoun C., Beytout D. et Mouchet J.** (1968) Epidémiologie du virus West Nile : étude d'un foyer en Camargue. III.-Les maladies humaines. *Ann Inst Pasteur (Paris)*, **115** (3): 435-445.
- Petersen L. R. et Hayes E. B.** (2008) West Nile virus in the Americas. *Med Clin North Am*, **92** (6): 1307-1322, ix.
- Pfeiffer D. U.** (2010) Veterinary Epidemiology : an introduction. Oxford: 135 p.
- Philip C. B. et Smadel J. E.** (1943) Transmission of West Nile virus by infected *Aedes albopictus*. *Proc Soc Exp Biol Med*, **48**: 537-548.
- Pradier S., Leblond A. et Durand B.** (2008) Land cover, landscape structure, and West Nile virus circulation in southern France. *Vector Borne Zoonotic Dis*, **8** (2): 253-263.
- Reisen W. et Brault A. C.** (2007a) West Nile virus in North America: perspectives on epidemiology and intervention. *Pest Manag Sci*, **63** (7): 641-646.
- Reisen W. K., Fang Y. et Martinez V. M.** (2005) Avian host and mosquito (Diptera: Culicidae) vector competence determine the efficiency of West Nile and St. Louis encephalitis virus transmission. *J Med Entomol*, **42** (3): 367-375.
- Reisen W. K., Fang Y., Lothrop H. D., Martinez V. M., Wilson J., Oconnor P., Carney R., Cahoon-Young B., Shafii M. et Brault A. C.** (2006) Overwintering of West Nile virus in Southern California. *J Med Entomol*, **43** (2): 344-355.
- Reisen W. K., Brault A. C., Martinez V. M., Fang Y., Simmons K., Garcia S., Omi-Olsen E. et Lane R. S.** (2007b) Ability of transstadially infected *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) to transmit West Nile virus to song sparrows or western fence lizards. *J Med Entomol*, **44** (2): 320-327.
- Reiter P.** (2010) West Nile virus in Europe : understanding the present to gauge the future. *Euro Surveill*, **15** (10): pii=19508.
- Rios L. M., Sheu J. J., Day J. F., Maruniak J. E., Seino K., Zaretsky H. et Long M. T.** (2009) Environmental risk factors associated with West Nile virus clinical disease in Florida horses. *Med Vet Entomol*, **23** (4): 357-366.
- Rispe R.** (1941) La fièvre de trois jours dans la région de Montpellier. *Thèse de doctorat de médecine*, Montpellier:
- Rizzo C., Vescio F., Declich S., Finarelli A. C., Macini P., Mattivi A., Rossini G., Piovesan C., Barzon L., Palu G., Gobbi F., Macchi L., Pavan A., Magurano F., Ciufolini M. G., Nicoletti L., Salmaso S. et Rezza G.** (2009) West Nile virus transmission with human cases in Italy, August - September 2009. *Euro Surveill*, **14** (40): pii=19353.

- Roberts R. S. et Foppa I. M.** (2006) Prediction of equine risk of West Nile virus infection based on dead bird surveillance. *Vector Borne Zoonotic Dis*, **6** (1): 1-6.
- Robin C. A., Wylie C. E., Wood J. L. N. et Newton J. R.** (2010) Making use of equine population demography for disease control purposes : preliminary observations on the difficulties of counting and locating horses in Great Britain. *Equine Vet J*, publié en ligne le 23 septembre 2010: doi : 10.1111/j.2042-3306.2010.00186.x.
- Rollin P. E., Rollin D., Martin P., Baylet R., Rodhain F. et Hannoun C.** (1982) Résultats d'enquêtes séroépidémiologiques récentes sur les arboviroses en Camargue : populations humaines, équines, bovines, et aviaires. *Médecine et Maladies Infectieuses*, **12** (2): 77-80.
- Sabakova K., Leblond A., Futas J., Janova E., Matiasovici J., Putnova L., Osickova J., Necesankova M., Vrtkova I., Vyskocil M., Vokata B. et Horin P.** (2008) Immunogenomic analysis of West Nile virus epidemics in the Camargue region. In "*Plant and Animal Genomes XVI Conference*", San Diego (CA, USA), 12-16 Jan 2008: Poster P587.
- Schmidt J. R. et Elmansoury H. K.** (1963) Natural and Experimental Infection of Egyptian Equines with West Nile Virus. *Ann Trop Med Parasitol*, **57**: 415-427.
- Swaddle J. P. et Calos S. E.** (2008) Increased avian diversity is associated with lower incidence of human West Nile infection: observation of the dilution effect. *PLoS One*, **3** (6): e2488.
- Taylor R. M., Hurlbut H. S., Dressler H. R., Spangler E. W. et Thrasher D.** (1953) Isolation of West Nile virus from Culex mosquitoes. *J Egypt Med Assoc*, **36** (3): 199-208.
- Terry C.** (2007) Etude démographique de la population équine en région Camargue. *Thèse de doctorat vétérinaire*, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon: 84 p.
- Tesh R. B., Parsons R., Siirin M., Randle Y., Sargent C., Guzman H., Wuithiranyagool T., Higgs S., Vanlandingham D. L., Bala A. A., Haas K. et Zerinque B.** (2004) Year-round West Nile virus activity, Gulf Coast region, Texas and Louisiana. *Emerg Infect Dis*, **10** (9): 1649-1652.
- Thompson M. C. et Connor S. J.** (2000) Environmental information systems for the control of arthropod vectors of disease. *Med Vet Entomol*, **14** (3): 227-244.
- Tomas-Roux C.** (1998) Le cheval de race Camargue : présentation générale de la race, étude démographique et dominantes pathologiques. *Thèse de doctorat vétérinaire*, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon: 99 p.
- Tran A., Gaidet N., L' Ambert G., Balenghien T., Balança G., Chevalier V., Soti V., Ivanes C., Etter E., Schaffner F., Baldet T. et de la Rocque S.** (2007) The use of remote sensing for the ecological description of multi-host disease systems: a case study on West Nile virus in southern France. *Vet Ital.*, **43** (3): 687-697.
- Trejejo R. T. et Eidson M.** (2008) Zoonosis update: West Nile virus. *J Am Vet Med Assoc*, **232** (9): 1302-1309.

- Turell M. J., Dohm D. J., Sardelis M. R., Oguinn M. L., Andreadis T. G. et Blow J. A.** (2005) An update on the potential of north American mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile Virus. *J Med Entomol*, **42** (1): 57-62.
- Veksler A., Eidson M. et Zurbenko I.** (2009) Assessment of methods for prediction of human West Nile virus (WNV) disease from WNV-infected dead birds. *Emerg Themes Epidemiol*, **6**: 4.
- Venter M., Steyl J., Human S., Weyer J., Zaayman D., Blumberg L., Leman P. A., Paweska J. et Swanepoel R.** (2009) Transmission of West Nile virus during horse autopsy. *Emerg Infect Dis*, **16** (3): 573-575.
- Ward M. P. et Carpenter T. E.** (2000) Techniques for analysis of disease clustering in space and in time in veterinary epidemiology. *Prev Vet Med*, **45** (3-4): 257-284.
- Ward M. P., Ramsay B. H. et Gallo K.** (2005) Rural cases of equine West Nile virus encephalomyelitis and the normalized difference vegetation index. *Vector Borne Zoonotic Dis*, **5** (2): 181-188.
- Ward M. P.** (2009) Equine West Nile virus disease occurrence and the Normalized Difference Vegetation Index. *Prev Vet Med*, **88** (3): 205-212.
- Zeller H., Zientara S., Hars J., Languille J., Mailles A., Tolou H., Paty M.-C., Schaffner F., Armengaud A., Gaillan P., Legras J.-F. et Hendrikx P.** (2004a) West Nile outbreak in horses in Southern France: September 2004. *Euro Surveill weekly*, **8** (41): pii=2564.
- Zeller H. G. et Schuffenecker I.** (2004b) 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** (3): 147-156.

ANNEXES

ANNEXE 1: LISTE DES PUBLICATIONS EN SEPTEMBRE 2010

I/ Publications scientifiques et valorisation :

- Articles dans des périodiques à comité de lecture :

2010 :

Pradier S, Lecollinet S, Leblond A. Review on West Nile Virus epidemiology and factors triggering change in its distribution.

Soumis à Rev Sci Tech OIE le 06 mai 2010.

Pradier S, Sandoz A, Lefebvre G, Tran A, Lecollinet S, Leblond A. Influence of water on the circulation of the West Nile Virus in horses in Southern France.

En cours de correction par les co-auteurs.

Tran A, L'Ambert G, Balança G, Pradier S, Grosbois V, Roche B, Etter E, Balenghien T, Baldet T, Leblond A, Fontenille D, Reiter P, Gaidet N. Impact of vector and host distribution on the processes of introduction, amplification and emergence of a multi-host infectious disease.

En cours de correction par les co-auteurs.

2008 :

Pradier S, Leblond A, Durand B. Land Cover, Landscape Structure, and West Nile Virus Circulation in Southern France. Vector Borne Zoonotic Dis. 2008, 8, 2 : 253-63.

2005 :

Leblond A, Pradier S, Pitel PH, Fortier G, Boireau P, Chadoeuf J, Sabatier P. [\[An epidemiological survey of equine anaplasmosis \(Anaplasma phagocytophilum\) in southern France\]](#) (French). Rev Sci Tech. 2005, 24(3):899-908.

- Communications orales lors de congrès :

Pradier S, Leblond A, Aumasson C, De Goer J. Surveillance syndromique des maladies infectieuses chez le cheval ou comment diagnostiquer une épidémie en population équine ? Congrès annuel AVEF (Association Vétérinaire Equine Française), Reims, 9-11 Oct 2008.

Pradier S, Leblond A, Durand B. Etude de prédiction du risque d'infection par le virus West Nile chez le cheval. Congrès annuel AVEF, Deauville, 18 au 20 octobre 2007

Tran A, L'Ambert G, Balança G, Pradier S, Grosbois V, Roche B, Etter E, Balenghien T, Baldet T, Leblond A, Fontenille D, Reiter P, Gaidet N. Impact of vector and host distribution on the processes of introduction, amplification and emergence of a multi-host infectious disease.

International Conference EDEN (Emerging Diseases in a changing European eNvironment), Montpellier, 10 au 12 mai 2010.

- Posters lors de congrès :

Pradier S, Sandoz A, Lefebvre G, Tran A, Lecollinet S, Leblond A. Influence of water on the circulation of the West Nile Virus in horses in Southern France. Congrès ISHEID (International Symposium on HIV and Emerging Infectious Diseases), Marseille, 24 au 26 mars 2010.

II/ Publications de développement ou de formation continue :

- Articles dans des périodiques à comité de lecture :

2009 :

Pradier S, Cadoré JL. Conduite thérapeutique devant une anémie due aux hémopathogènes non viraux chez les équidés. Le Nouveau Praticien Vét. Equine, 2009, 5. 219 : 29-34.

Ténédos S, Lallemand E, Pradier S. Comment réaliser une transfusion chez le cheval ? Le Nouveau Praticien Vét. Equine, 2009, 5. 219 : 54-59.

Zilberstein L, Pradier S. L'anesthésie lors de troubles hépatiques. Informations Chirurgicales Vétérinaires, 2009, 8, 2 : 19-23.

2008 :

Pradier S, Tilliette B, Boulouis H-J, Pitel P-H, Leblond A. Diagnostiquer et traiter l'anaplasmose granulocytaire chez le cheval. Le Nouveau Praticien Vét. Equine, 2008, Hors-série Maladies infectieuses, 5 : 87-92.

Chahory S, Pradier S. Evaluation de la sécrétion lacrymale chez le cheval et le poney par le fil au rouge de phénol. Prat Vét Eq, 2008, 40, 160 : 71-2.

2007 :

Merlin N, Pradier S, Giraudet A. L'incontinence urinaire et ses complications chez un cheval hongre boulonnais de onze ans. Prat Vét Eq, 2007, 39, 153 : 61-66.

Zilberstein L, Pradier S. L'anesthésie lors de défaillance de la fonction rénale. Informations Chirurgicales Vétérinaires, 2007, 5, 17-20.

- Communications orales lors de congrès :

Pradier S. Les ulcères gastriques chez le cheval : signes d'appel et prévention. 4èmes Rencontres Scientifiques/Professionnels du cheval AVEF, Deauville, 17 octobre 2007

Pradier S, Vanore M, Carette O, Payen G, Saunier E, Verite G, Clerc B, Sanaa M, Chahory S. Evaluation du test oculaire du fil au rouge de phénol chez des poneys et des chevaux sains. Congrès annuel AVEF, Versailles, Octobre 2006.

- Posters lors de congrès :

Tilliette B, Leblond A, Pradier S, Boulouis HJ. *Anaplasma phagocytophilum* infections in horses in the South of France: an emerging disease ? Congrès ECEIM (European College of Equine Internal Medicine), Barcelone, 28 au 30 janvier 2009.

ANNEXE 2: DOCUMENTS UTILISES PENDANT LES ENQUETES DE 2007 ET 2008

QUESTIONNAIRES ENVIRONNEMENT

Questionnaire Site – environnement 2007

Indications d'itinéraire :

Date : N° indetification du site

Vétérinaire traitant :

Enquêteur :

Etablissement :

Nom :

Adresse :

Tél. / Fax :

Mail :

I) GEOREFERENCEMENT DU SITE

Coordonnées (UTM WGS84 décimal) : X = Y = Z =

Proximité bâtiments d'élevage Couloir/corral Pâturage d'été Pâturage d'hiver

II) CARACTERISTIQUES DE L'EXPLOITATION (nouvelles exploitations)

- Activité principale :
- Nombre total d'équidés :
- Surface pour l'activité d'élevage (chevaux et bovins, ovins) :
- Nombre de parcelles à disposition des chevaux :
- Localiser les parcelles sur une carte, préciser la période pendant laquelle ces parcelles sont occupées par des chevaux appartenant à l'exploitation.

III) ANIMAUX DOMESTIQUES

Chevaux =

Poneys =

Anes =

Mules =

Vaches =

Moutons =

Chèvres =

Porcs =

Canards =

Poules =

Autres (pigeons, oies...) =

IV) REMARQUES ET SUGGESTIONS

Annexes

QUESTIONNAIRE CHEVAL 2007

Date:

Nom Proprio

code cheval	nom du cheval	race	âge	sexe	père	mère	activité	acquis	WN 2004	maladies récentes	nb de mélanomes	taille du + gros	devenir
190601	ENZO												
190602	MISTRAL												
190603	MOCA												

QUESTIONNAIRE CHEVAL 2008

Date : **NOM PROPRIETAIRE**

code cheval	nom du cheval	race	âge	sexe	activité	acquis	WN 2004	WN 2007	Anaplasma 2007	maladies récentes (depuis 1 an)	Tiques récoltées OUI/NON	devenir	Remarques
100101	Jonc J3	Camargue	1997	H	Loisir+ balade	2000	1	1	0	0		Ok	
100102	Juglans d'Asport J5	Camargue	1997	H	Loisir+ balade	2002	?	1	0	0		Ok	
100103	Indien	Cheval de Selle	1996	?	?	2000	?	?	?	?		vendu en 2002	
100104	Ishou de Muria	Cheval de Selle	1996	F	Club + balade	2000	0	0	0	0		Ok	
100105	Prince 1	OI (Camargue)	1990	H	Club + balade	?	0	0	0	0		Ok	
100106	Prince 2	Camargue	1992	H	Club + balade	2000	0	0	0	0		Ok	
100107	IDEM	Anglo-arabe	1996	H	?	?	0	?	?	?		mort coliques en 2006	
100108	BABY	PS	1994	H	Club	2001	0	0	0	0		Ok	
100109	LASCAR	SF	1999	H	Loisir+ balade	2003	1	0	0	0		Ok	
100110	HARMONIE	SF	1995	F	Elevage	2000	0	0	0	naviculaire		Ok	
100111	GASPER	Camargue	1994	H	?	2002	0	?	?	?		vendu 2006	
100112	Pacha	?	1997	?	?	2004	0	?	?	?		vendu en 2005	
100113	Apache	?	1996	?	?	2000	?	?	?	?		vendu en 2005	
100114	Magma	?	1999	?	?	2003	0	?	?	?		vendue	



ETUDE WEST NILE CHEZ LE CHEVAL

Consentement éclairé des propriétaires ou des responsables d'écuries

L'objectif de cette enquête est de poursuivre l'analyse des facteurs de risque environnementaux et génétiques favorables à une persistance, voire à une émergence du virus West Nile dans le sud de la France, en étudiant la circulation du virus dans une population choisie de chevaux, plusieurs années successives.

Au cours de cette enquête, des prises de sang seront effectuées sur vos chevaux une fois cette année. Les résultats seront transmis à votre vétérinaire gratuitement (délai prévu : décembre 2007). Une réunion d'information sera organisée à l'intention des éleveurs et des propriétaires en fin d'année, afin de vous informer de l'évolution de nos travaux et des premiers résultats obtenus.

Je soussigné(e), Madame, Monsieur,
résidant.....

autorise les responsables de l'étude à utiliser les informations recueillies dans le cadre de leur étude.

J'ai bien noté que l'ensemble des informations seront confidentielles, que je dispose d'un droit d'accès et de modification des données me concernant et que les résultats seront conservés de manière totalement anonyme.

Le droit d'accès s'exerce auprès des :

- Dr. Agnès LEBLOND, Maître de Conférences à l'Ecole Vétérinaire de Lyon, 1 avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Etoile (Tel : 04 78 87 27 33, Fax : 04 78 87 26 75, Email : a.leblond@vet-lyon.fr)
- Dr Sophie PRADIER, Chargée de consultation à la clinique équine de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7, Avenue du Général de Gaulle 94700 Maisons-Alfort (Tél : 01 43 96 71 07, Fax : 01 43 96 73 10, Email : spradier@vet-alfort.fr)

Fait le
à.....

ETUDE DE MALADIES INFECTIEUSES CHEZ LE CHEVAL (West Nile, Anaplasmose équine)

Consentement éclairé des propriétaires ou des responsables d'écuries

L'objectif de cette enquête est de poursuivre l'analyse des facteurs de risque environnementaux favorables à une persistance, voire à une émergence des agents responsables de la maladie de West Nile et de l'anaplasmose équine dans le sud de la France, en étudiant la circulation de ces agents dans une population choisie de chevaux, plusieurs années successives.

Au cours de cette enquête, des prises de sang seront effectuées sur vos chevaux une fois cette année. Les résultats vous seront transmis, ainsi qu'à votre vétérinaire, gratuitement. Une réunion d'information sera organisée à l'intention des éleveurs et des propriétaires au printemps 2009, afin de vous informer de l'évolution de nos travaux et des premiers résultats obtenus.

Je soussigné(e), Madame, Monsieur,
résidant.....,

autorise les responsables de l'étude à utiliser les informations recueillies dans le cadre de leur étude.

J'ai bien noté que l'ensemble des informations seront confidentielles, que je dispose d'un droit d'accès et de modification des données me concernant et que les résultats seront conservés de manière totalement anonyme.

Le droit d'accès s'exerce auprès des :

- Dr. Agnès LEBLOND, Maître de Conférences à l'Ecole Vétérinaire de Lyon, 1 avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Etoile (Tel : 04 78 87 27 33, Fax : 04 78 87 26 75, Email : a.leblond@vet-lyon.fr)

- Dr Sophie PRADIER, Maître de Conférences à la clinique équine de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7, Avenue du Général de Gaulle 94700 Maisons-Alfort (Tél : 01 43 96 71 07, Fax : 01 43 96 73 10, Email : spradier@vet-alfort.fr)

Fait le
à.....

Le cheval a-t-il montré un des signes suivants ? (si symptômes neuros, cf fiche spécifique)

Syndrome hyperthermie	Dépression, apathie	<input type="checkbox"/>
	Anorexie, baisse d'appétit	<input type="checkbox"/>
	Ptyalisme	<input type="checkbox"/>
	Fièvre	<input type="checkbox"/>
	Ictère	<input type="checkbox"/>
	Anémie, muqueuses pâles	<input type="checkbox"/>
	Oedèmes des membres	<input type="checkbox"/>
	Autre (soif,...) _ _ _ _ _	<input type="checkbox"/>
Syndrome digestif	Coliques	<input type="checkbox"/>
	Diarrhée	<input type="checkbox"/>
	Dysphagie, difficultés de déglutition	<input type="checkbox"/>
	Amaigrissement	<input type="checkbox"/>
	Autre (ulcères buccaux,)	<input type="checkbox"/>
Syndrome uro – génital	Poulinage	<input type="checkbox"/>
	Avortement	<input type="checkbox"/>
	Autre _ _ _ _ _	<input type="checkbox"/>
Syndrome respiratoire	Toux	<input type="checkbox"/>
	Jetage	<input type="checkbox"/>
	Difficultés respiratoires	<input type="checkbox"/>
	Autre _ _ _ _ _	<input type="checkbox"/>
Syndrome oculaire	Epiphora, larmolement	<input type="checkbox"/>
	Conjonctivite, œil rouge	<input type="checkbox"/>
	Œil fermé	<input type="checkbox"/>
	Autre _ _ _ _ _	<input type="checkbox"/>
Syndrome cutané	Dermite estivale récidivante	<input type="checkbox"/>
	Mélanomes :	
	Nombre :	_____
	Taille du plus gros (entourer) :	noix mandarine orange >>
	Localisation du plus gros :	
Autre _ _ _ _ _		
Syndrome locomoteur	Boiterie	<input type="checkbox"/>
	Fourbure	<input type="checkbox"/>
	Autre _ _ _ _ _	<input type="checkbox"/>
Syndrome nerveux	Augmentation de l'appréhension	<input type="checkbox"/>
	Grincements de dents	<input type="checkbox"/>
	Amaurose	<input type="checkbox"/>
	Tremblements musculaires	<input type="checkbox"/>
	Ataxie (préciser ant/post, symétrique ou non)	<input type="checkbox"/>
	Paralysie flasque de la lèvre inférieure	<input type="checkbox"/>
	Faiblesse des membres, parésie	<input type="checkbox"/>
	Paralysie des membres (préciser lequel)	<input type="checkbox"/>
	Incapacité à se tenir debout	<input type="checkbox"/>
	Autre _ _ _ _ _	

**ANNEXE 3: RAPPORT DE VALIDATION INTERNE DU KIT ID SCREEN
WEST NILE COMPETITION**



RAPPORT DE VALIDATION INTERNE ID Screen West Nile competition

 LERQAP

 LERPAZ

Intitulé du rapport de validation : rapport de validation interne du kit ID Screen West Nile Competition

N° de révision de la méthode : ver 0308

Date : 03/06/2009

Type de méthode			
Type	<input type="checkbox"/> Quantitative	<input checked="" type="checkbox"/> Qualitative	<input type="checkbox"/> Semi-quantitative
Origine	<input checked="" type="checkbox"/> Nouvelle méthode : kit commercial		
	<input type="checkbox"/> Méthode publiée non normalisée <input type="checkbox"/> Projet de méthode normalisée <input type="checkbox"/> Adaptation d'une méthode (normalisée, publiée) <input type="checkbox"/> Autre :		
Synthèse des résultats			
Paramètres de performance	Critères d'acceptation (spécifications)	Résultats obtenus	Référence du document utilisé
Sensibilité	Sensibilité équivalente à la méthode de référence OIE de neutralisation en plages de lyse	Sensibilité satisfaisante	MO-VIRO-14 et chapitre 2.1.20 sur West Nile du Manuel des Tests de Diagnostic et des Vaccins pour les Animaux Terrestres publié en 2008
Spécificité	Spécificité équivalente à la méthode de référence OIE de neutralisation en plages de lyse	Spécificité identique	MO-VIRO-14 et chapitre 2.1.20 sur West Nile du Manuel des Tests de Diagnostic et des Vaccins pour les Animaux Terrestres publié en 2008
Conclusion générale			
Les sensibilité et spécificité du kit ID Screen West Nile competition sont satisfaisantes.			



AGENCE FRANÇAISE
DE SÉCURITÉ SANITAIRE
DES ALIMENTS

Site de Maisons-Alfort

RAPPORT DE VALIDATION INTERNE

ID Screen West Nile competition

CHAPITRE I – INTRODUCTION

1) Texte de la méthode

L'identification des anticorps d'équidés spécifiques de la fièvre du Nil Occidental (ou virus West-Nile) par technique ELISA IgG fait partie des épreuves sérologiques recommandées par l'Office International des Epizooties (OIE) décrites dans le chapitre 2.1.20. du Manuel des Tests de Diagnostic et des Vaccins pour les Animaux Terrestres publié en 2008 (introduction de la partie 2), mais aucun mode opératoire particulier n'est préconisé. La méthode d'analyse de la trousse commerciale « ID-Screen West Nile Competition » est donc compatible avec ces recommandations.

En annexe 1 est fournie la notice d'utilisation du kit ID Screen West Nile competition. A partir de cette notice a été dérivé le mode opératoire MO-VIRO-14 « Recherche des anticorps IgG spécifiques du virus de la fièvre du Nil Occidental chez les équidés par ELISA « ID-Screen West Nile Competition » ».

2) Objectifs de la validation interne

La validation interne a pour objectif de vérifier les performances du kit ELISA ID Screen West Nile competition dans le cadre de la détection des IgG spécifiques du virus West-Nile. Elle s'appuie sur le dossier de validation effectué initialement par le fournisseur et sur la vérification des performances des lots de kits distribués (voir fiches de contrôle qualité en annexe 2).

CHAPITRE II – ORGANISATION DE LA VALIDATION INTERNE

1) Echantillons

Les échantillons utilisés pour la validation interne sont les échantillons de l'EILA « sérologie de l'infection équine à virus West-Nile » organisé en avril 2008 et sont constitués de sérums équins contenant ou non des anticorps (IgG) dirigés contre le virus West-Nile ; ces sérums provenaient, pour la plus grande partie, d'une enquête effectuée en 2007 sur des équidés de la région de la Camargue (A. Leblond, S. Pradier).

Le panel de sérum à disposition avait été au préalable analysé avec la technique ELISA ID Screen West Nile indirect, reconnue par la DGAI comme test de détection des anticorps IgG dirigés contre le virus West Nile (EILA 2006 et 2008) et se décomposait comme suit :

- * 5 échantillons constituant une gamme de détection des anticorps dirigés contre le virus West Nile, correspondant à des dilutions successives d'un facteur 2 (du 1/2 au 1/32) d'un sérum équin positif (JAMAALI) dans un pool de sérums équins négatifs.

- * 6 échantillons positifs, 3 fortement positifs et 3 faiblement positifs (critère de classification : $\% S/P = \frac{DO_{\text{échantillon}}}{DO_{\text{contrôle positif}}} \times 100$ avec le kit ELISA ID Screen West Nile indirect compris entre 50 et 100% pour les sérums faiblement positifs et supérieur à 100% pour les sérums fortement positifs).

- * 2 échantillons douteux (%S/P avec le kit ELISA ID Screen West Nile indirect compris entre 30 et 50% au moins une fois au cours de cinq déterminations successives)

- * 11 négatifs, dont 2 présentant une fixation non spécifique sur les antigènes du virus West Nile (des sérums équins réagissant de façon non spécifique en ELISA indirect sont retrouvés dans environ 2% des sérums analysés).

2) Méthode analytique

Ce panel de 24 sérums a été analysé selon 3 méthodes, à savoir la technique ELISA commerciale disponible jusqu'en avril 2008 et reconnue par la DGAI comme test de détection des IgG West Nile (ID Screen West Nile Indirect), l'ELISA ID Screen West Nile competition (disponible à partir de début 2008) et la technique de référence OIE de séroneutralisation par réduction des plages de lyse. La comparaison des résultats obtenus avec les 3 techniques nous permet de comparer les performances du kit ID Screen West Nile competition à celles des deux autres méthodes.

CHAPITRE III – RESULTATS (voir Annexe 3)

Le tableau en annexe 3 présente les résultats qualitatifs (-, + et douteux) obtenus sur les 24 échantillons de l'EILA avec les 3 méthodes.

Les résultats obtenus pour le kit ID Screen West Nile competition devaient satisfaire aux exigences suivantes :

* une spécificité équivalente ou légèrement plus faible à la méthode de référence OIE de neutralisation en plages de lyse était attendue (l'ELISA IgG peut mettre en évidence des anticorps induits après infection avec des virus proches du virus West Nile (réactions croisées souvent observées), alors que la technique de neutralisation par réduction des plages de lyse met en évidence des anticorps dirigés spécifiquement contre le virus West Nile).

* une sensibilité équivalente à la méthode de référence OIE de neutralisation en plages de lyse était attendue

Au vu des résultats, les performances des kits ELISA ID Screen West Nile competition et indirect sont comparables en terme de spécificité et de sensibilité (les sérums trouvés +/douteux sont comptabilisés comme positifs).

indirect \ competition	Sérum positif	Sérum négatif
Sérum positif	12	0
Sérum négatif	0	12

La comparaison des résultats obtenus pour le kit ID Screen West Nile competition et la méthode de neutralisation par réduction des plages de lyse laisse apparaître une sensibilité légèrement supérieure de la technique ELISA ID Screen West Nile competition pour 3 sérums ; ces 3 sérums positifs en ELISA étaient toxiques à la première dilution, la dilution seuil, du test de séroneutralisation et apparaissaient négatifs à la dilution suivante (il peut s'agir de sérums comportant très peu d'anticorps dirigés contre le virus West Nile, la lecture ayant été gênée par la cytotoxicité des sérums ; la difficulté d'interprétation de la séroneutralisation pour ces 3 sérums ne permet pas de comptabiliser ces sérums dans le tableur récapitulatif suivant). Un sérum positif en séroneutralisation (sérum positif fortement dilué, avec un titre seuil de 10) apparaît toutefois négatif en ELISA ID Screen West Nile competition.

compétition \ séroneutralisation	Sérum positif	Sérum négatif
Sérum positif	9	1
Sérum négatif	0	11

Les spécificités des techniques ELISA ID Screen West Nile competition et de neutralisation par réduction des plages de lyse apparaissent ici comparables. La sensibilité de la technique ELISA ID Screen West Nile competition apparaît satisfaisante : un sérum positif en IgG West Nile et fortement dilué (1/32) est non détecté avec l'ELISA ID Screen West Nile competition et avec l'ELISA indirect.

Annexe 1 : notice d'utilisation du kit ID Screen West Nile competition

Validation

Le test est valide si :

✓ la valeur moyenne de densité optique des Contrôles Négatifs (DO_{cn}) est supérieure à 0,700.

$DO_{cn} > 0,700$

✓ la valeur moyenne de densité optique des Contrôles Positifs (DO_{cp}) est inférieure à 30% de la DO_{cn} .

$DO_{cp} / DO_{cn} < 0,3$

Interprétation

Pour chaque échantillon, calculer le pourcentage SN (% SN) :

$$SN = \frac{DO_{\text{échantillon}}}{DO_{cn}} \times 100$$

Les échantillons présentant un SN :

- inférieur ou égal à 40% sont considérés comme positifs,
- inférieur ou égal à 50% et supérieur à 40% sont considérés comme douteux.
- supérieur à 50% sont considérés comme négatifs.

Résultat	Statut
SN ≤ 40%	POSITIF
40% < SN < 50%	DOUTEUX
SN > 50%	NEGATIF

ID VET
innovative
diagnostics

ID Screen®
West Nile Competition

Kit de détection des anticorps anti-pr-E du virus West Nile dans les sérums de chevaux et d'oiseaux.

Monocupule

192 réactions

Usage *in vitro*



WNC ver 0308-2P FR

Information générale

Ce kit de diagnostic est destiné à la mise en évidence, par la méthode ELISA de compétition, d'anticorps de cheveau et d'oiseaux dirigés contre la protéine d'enveloppe (p-E) de la West-Nile, contenant un épitope commun à l'Encephalite japonaise.

Description et principe

Les cupules sont sensibilisées avec un extrait purifié du virus de la West Nile.

Les échantillons à tester et les contrôles, dilués au 1/2, sont distribués dans les cupules. Les anticorps anti- p-E, s'ils sont présents, forment un complexe antigène-anticorps.

Un conjugué anti-p-E marqué à la peroxydase (Po) est distribué dans les cupules. Il se fixe à la p-E restée libre, formant un complexe antigène-anticorps-conjugué-Po.

Après élimination du conjugué en excès par lavage, la réaction est révélée par une solution de révélation (TMB).

La coloration qui en résulte est liée à la quantité d'anticorps spécifiques présents dans l'échantillon à tester :

1. en l'absence d'anticorps dans l'échantillon, il apparaît une coloration bleue qui devient jaune après blocage.
2. en présence d'anticorps dans l'échantillon, il n'apparaît pas de coloration.

La lecture est réalisée à une longueur d'onde de 450 nm.

Composants du Kit

Réactifs	Qté
Microplaques sensibilisées avec l'antigène purifié.	2
Conjugué Concentré (10X)	3 ml
Contrôle Positif	0,5 ml
Contrôle Négatif	1 ml
Tampon de dilution 2	60 ml
Solution de lavage concentrée (20X)	60 ml
Solution de révélation (TMB)	60 ml
Solution d'arrêt (H ₂ SO ₄ 0,5 M)	60 ml

1. Le conjugué, les contrôles, et la solution de révélation doivent être stockés à 5°C (± 3°C)
2. Les autres réactifs (dont les plaques) peuvent être stockés entre +2°C et +25°C.
3. Les composants portant la même dénomination (*solution de lavage, tampons de dilution*) peuvent être utilisés dans l'ensemble de la gamme ID-VET.

Matériel nécessaire mais non fourni

1. Pipettes de précision mono ou multi-canaux capables de délivrer des volumes de 10 µl, 100 µl, 200 µl.
2. Embouts de pipette à usage unique.
3. Lecteur de microplaques à 96 puits.
4. Eau distillée ou déionisée.
5. Système de lavage manuel ou automatique.

Remarques et précautions d'emploi

1. Ne pas pipeter à la bouche.
2. La solution de révélation peut être irritante pour la peau.
3. La solution d'arrêt (H₂SO₄ 0,5M) peut provoquer de graves brûlures (R35). En cas de contact avec la peau ou les yeux, laver immédiatement et abondamment à l'eau et consulter un médecin (S26).
4. Ne pas exposer la solution de révélation à une lumière vive ni à des agents oxydants.
5. Décontaminer tous les réactifs avant élimination.

Préparation des échantillons

Pour réduire la différence des temps d'incubation entre les échantillons, il est possible de préparer une microplaque de 96 puits contenant les échantillons à tester et les échantillons de contrôle, puis de les transférer dans la plaque ELISA avec une pipette multicanaux.

Préparation de la Solution de lavage

Si nécessaire, ramener la Solution de lavage concentrée (20X) à température ambiante (21°C ± 5°C) et bien agiter pour assurer la dissolution des cristaux.

Préparer la Solution de lavage (1X) par dilution de la solution de lavage (20X) dans de l'eau distillée/déionisée.

Mode opératoire

Ramener tous les réactifs à température ambiante (21°C ± 5°C) avant l'emploi et les homogénéiser par retournement ou au Vortex.

1. Distribuer :
 - 50 µl de **Tampon de dilution 2** dans chaque puits.
 - 50 µl de **Contrôle Positif** dans les cupules A1 et B1.
 - 50 µl de **Contrôle Négatif** dans les cupules C1 et D1.
 - 50 µl de **chaque échantillon** à tester dans les cupules restantes.
2. Incuber **90 min ± 5 min** à 21°C (±5°C).
3. Laver 3 fois chaque cupule avec environ 300 µl de **Solution de lavage**. Eviter le dessèchement des cupules entre les lavages.
4. Préparer le **Conjugué 1X** en diluant le **Conjugué 10X** au 1/10^{ème} en **Tampon de dilution 2**.
5. Distribuer 100 µl de **Conjugué 1X** dans chaque cupule.
6. Incuber **30 min ± 3 min** à 21°C (±5°C).
7. Laver 3 fois chaque cupule avec environ 300 µl de **Solution de lavage**. Eviter le dessèchement des cupules entre les lavages.
8. Distribuer 100 µl de **Solution de révélation** dans chaque cupule.
9. Incuber **15 min ± 2 min** à 21°C (±5°C) à l'obscurité.
10. Distribuer 100 µl de **Solution d'arrêt** dans chaque cupule pour arrêter la réaction.
11. Mesurer et enregistrer les densités optiques.



FICHE DE CONTROLE QUALITE – QUALITY CONTROL DATA SHEET

ELISA WEST NILE COMPETITION / WEST NILE COMPETITION ELISA

Code Produit / Product code : WNC - N° de lot / Batch : 110 - Exp. : 09/2009

COMPOSITION DU KIT /KIT COMPONENTS

		Lot / Ch.-B.	Exp./Verw.bis/ Cad./Scad
2 x 1	Microplates coated with purified antigen. 12 strips of 8 microwells	620-003	03/2010
1 ml	Positive Control / Contrôle positif	320-002	02/2010
1 ml	Negative Control / Contrôle négatif	26-001	06/2010
60 ml	Dilution buffer 2 / Tampon de Dilution 2	2-005	10/2010
3 ml	Conjugate 10X / Conjugué 10X	420-003	02/2010
60 ml	Wash concentrate 20X / Solution de lavage concentrée 20X	15-002	09/2009
60 ml	Substrate solution / Solution de révélation	7-005	01/2010
60 ml	Stop solution / Solution d'arrêt	10-001	10/2009

Product Code	WNC	Lot / Ch.-B.	110
Insert/ Mode d'emploi	0308-2	Exp./Verw.bis/Cad./Scad	09/2009

ACTIVITE / ACTIVITY

DO corrigée moyenne du Contrôle Négatif / Mean corrected OD of Negative Control	1.769
DO corrigée moyenne du Contrôle Positif / Mean corrected OD of Positive Control	0.131

CONTROLE DE LA DETECTABILITE / DETECTABILITY CONTROL

La détectabilité est obtenue par dilution d'un sérum positif fort (standard interne ID VET) dans un sérum négatif. Ce standard permet de garantir une détectabilité constante d'un lot de kit à l'autre.

The detectability is tested using an internal standard (a strong positive serum diluted in a negative one) proposed by ID VET. By analyzing the detectability of this internal standard, ID VET is able to guarantee that the kit's detectability remains constant between batches.

CONTROLE DE LA SENSIBILITE / SENSITIVITY CONTROL

12 sérums de chevaux positifs testés (origine : Camargue, France) : les 12 échantillons ont été trouvés positifs.
12 positive horse sera were tested (origin : Camargue, France) : these 12 samples were found positive.

CONTROLE DE LA SPECIFICITE / SPECIFICITY CONTROL

200 sérums de chevaux et d'oiseaux négatifs testés (origine : France) : tous les échantillons ont été trouvés négatifs.
200 negative horse and bird samples were tested (origin : France) : all samples were found negative.

CONTROLE DE LA REPETABILITE / REPEATABILITY CONTROL

La répétabilité a été évaluée par la mesure du coefficient de variation sur 48 répétitions du contrôle positif et d'un sérum faiblement positif : ce coefficient de variation est respectivement de 7 et 9%
The repeatability was evaluated by measuring the coefficient of variation for 48 repetitions of the positive control and a weak positive serum : this coefficient of variation was respectively 7 and 9%.


Quality Control Manager
Responsable Contrôle Qualité


Director
Directeur

167 rue Medhi Ben Barka - GAROSUD - 34070 MONTPELLIER - France
Tel : + 33 (0)4 67 41 49 33 - Fax : + 33 (0)4 67 45 36 95 www.id-vet.com - E-mail : ldvet.info@id-vet.com
SIRET 478 123 219 00014 APE 731 z TVA FR 17478123219

DOC 445

QUALITY CONTROL DATA SHEET – FICHE DE CONTRÔLE QUALITÉ

ID Screen® West Nile Competition – Screening test

Product code / Code Produit : WNC
 Batch / N° de lot : 145 - Exp. : 12/2010 Fabrication 12/2008

KIT COMPONENTS / COMPOSITION DU KIT

		Lot / Ch.-B.	Exp./Verw.bis/ Cad./Scad
2 x 1	Microplates coated with purified antigen (12x8) / <i>Microplaques sensibilisées avec l'antigène purifié (12x8)</i>	620-004	12/2010
1 ml	Positive Control / <i>Contrôle positif</i>	320-003	12/2010
1 ml	Negative Control / <i>Contrôle négatif</i>	26-002	12/2011
60 ml	Dilution buffer 2 / <i>Tampon de Dilution 2</i>	2-006	05/2012
3 ml	Conjugate 10X / <i>Conjugué 10X</i>	420-004	12/2010
60 ml	Wash concentrate 20X / <i>Solution de lavage concentrée 20X</i>	15-003	10/2012
60 ml	Substrate solution / <i>Solution de révélation</i>	7-006	01/2011
60 ml	Stop solution / <i>Solution d'arrêt</i>	10-003	05/2013
Product Code Insert/ Mode d'emploi	WNC 0308-2	Lot / Ch.-B. Exp./Verw.bis/Cad./Scad	145 12/2010

ACTIVITY / ACTIVITE

Mean corrected OD of Negative Control / *DO corrigée moyenne du Contrôle Négatif* 1.769
 Mean corrected OD of Positive Control / *DO corrigée moyenne du Contrôle Positif* 0.131

DETECTABILITY CONTROL / CONTROLE DE LA DETECTABILITE

The detectability is tested using an internal standard (a strong positive serum diluted in a negative one) proposed by ID VET.

By analyzing the detectability of this internal standard, ID VET is able to guarantee that the kit's detectability remains constant between batches.

La détectabilité est obtenue par dilution d'un sérum positif fort (standard interne ID VET) dans un sérum négatif. Ce standard permet de garantir une détectabilité constante d'un lot de kit à l'autre.

SENSITIVITY CONTROL / CONTROLE DE LA SENSIBILITE

12 positive horse sera were tested (origin : Camargue, France) : these 12 samples were found positive.

12 sérum de chevaux positifs testés (origine : Camargue, France) : les 12 échantillons ont été trouvés positifs.

SPECIFICITY CONTROL / CONTROLE DE LA SPECIFICITE

200 negative horse and bird samples were tested (origin : France) : all samples were found negative.

200 sérum de chevaux et d'oiseaux négatifs testés (origine : France) : tous les échantillons ont été trouvés négatifs.

REPEATABILITY CONTROL / CONTROLE DE LA REPETABILITE

The repeatability was evaluated by measuring the coefficient of variation for 48 repetitions of the positive control and a weak positive serum : this coefficient of variation was respectively 7 and 9%.

La répétabilité a été évaluée par la mesure du coefficient de variation sur 48 répétitions du contrôle positif et d'un sérum faiblement positif : ce coefficient de variation est respectivement de 7 et 9%.


 Quality Control Manager : S. Lesceu
 Responsable Contrôle Qualité
stephanie.lesceu@id-vet.com


 Director : Philippe Pourquier
 Directeur
philippe.pourquier@id-vet.com

167 rue Medhi Ben Barka - GAROSUD - 34 070 MONTPELLIER - FRANCE
 Tel : + 33 (0)4 67 41 49 33 - Fax : + 33 (0)4 67 45 36 95 www.id-vet.com - E-mail : idvet.info@id-vet.com
 SIRET 478 123 219 00014 APE 731 z TVA FR 17478123219

DOC 763

Annexe 3 : résultats de la validation interne du kit ID Screen West Nile competition

numéro AFSSA	échantillon (sérum) animal	identification	dilution	ID Screen West Nile indirect, lot 069, 11/03/2008	Séronéutralisation, Vero NK P.45, 16/05/2008	ID Screen West Nile competition, lot 110 30/04/2008
1	230310	Camargue2007, Boîte 4	PUR	-	Négatif	-
2	JAMAALI	08-00169, D-08-086	1/8	+ faible (84%)	+, titre = 30 (cytolytique jusqu'au 1/10)	+
3	112604	Camargue2007, Boîte 2	PUR	+/douteux (50%)	Négatif (cytolytique jusqu'au 1/10)	+
4	190802	Camargue2007, Boîte 4	PUR	-	Négatif	-
5	112601	Camargue2007, Boîte 2	PUR	+ (232%)	+, titre = 30	+
6	210805	Camargue2007, Boîte 2	PUR	-	Négatif	-
7	JAMAALI	08-00169, D-08-086	1/4	+ (132%)	+, titre = 30 (cytolytique jusqu'au 1/10)	+
8	100909	Camargue2007, Boîte 4	PUR	-	Négatif	-
9	220115	Camargue2007, Boîte 2	PUR	+ faible (63%)	Négatif (cytolytique jusqu'au 1/10)	+
10	241115	Camargue2007, Boîte 4	PUR	-	Négatif	-
11	JAMAALI	08-00169, D-08-086	1/16	+/douteux (49%)	+, titre = 10	+/douteux
12	JAMAALI	08-00169, D-08-086	1/32	-	+, titre = 10	-
13	110147	Camargue2007, Boîte 4	PUR	+ faible (85%)	+, titre = 10	+
14	112105	Camargue2007, Boîte 4	PUR	+ (132%)	+, titre = 30	+
15	220715	Camargue2007, Boîte 2	PUR	- BF	Négatif	-
16	211209	Camargue2007, Boîte 4	PUR	-	Négatif	-
17	220102	Camargue2007, Boîte 2	PUR	-	Négatif	-
18	111628	Camargue2007, Boîte 6	PUR	+/douteux (51%)	Négatif (cytolytique jusqu'au 1/10)	+
19	JAMAALI	08-00169, D-08-086	1/2	+ (175%)	+, titre = 90 (cytolytique jusqu'au 1/10)	+
20	110164	Camargue2007, Boîte 4	PUR	-	Négatif	-
21	110152	Camargue2007, Boîte 4	PUR	-	Négatif	-
22	110130	Camargue2007, Boîte 4	PUR	+ (260%)	+, titre = 270 (cytolytique jusqu'au 1/10)	+
23	220716	Camargue2007, Boîte 2	PUR	- BF	Négatif	-
24	110105	Camargue2007, Boîte 4	PUR	+ faible (57%)	+, titre = 30	+/douteux

Circulation enzootique du virus West Nile en population équine : identification de facteurs de risque environnementaux en Camargue, France

L'objectif était d'évaluer le risque de circulation enzootique du virus West Nile (WN) chez le cheval en Camargue, région dans laquelle ce virus a déjà causé plusieurs épidémies (1962, 2000 et 2004). L'épidémiologie de la maladie de WN est très complexe, du fait de l'implication potentielle d'un grand nombre d'espèces de vecteurs et d'hôtes. De par sa transmission principalement vectorielle, la circulation du virus WN est fortement influencée par des facteurs environnementaux. L'espèce équine a été choisie comme témoin de la circulation du virus WN, car le cheval est particulièrement sensible à l'infection par ce virus. La méthode appliquée dans nos travaux est basée sur l'utilisation du lien direct existant entre l'environnement et la circulation enzootique du virus WN, par l'étude de la séropositivité (IgG) chez le cheval. Dans les deux premières études présentées, certains facteurs de risque environnementaux ont été identifiés, comme des classes d'occupation du sol (zones agricoles hétérogènes, végétation inondée) ou des indices de paysage (Indice d'Imbrication et de Juxtaposition), ayant conduit à l'élaboration d'une carte de risque pour cette circulation dans le bassin méditerranéen français. Des facteurs de risque individuels, comme la race, l'âge et l'activité du cheval, ont également été identifiés. Dans la troisième étude présentée, des hypothèses de transmission du virus en Camargue ont été testées. Dans la région d'étude, le virus serait introduit par les oiseaux migrateurs et amplifié par *Culex modestus* et plusieurs espèces d'oiseaux compétentes. L'effet de dilution n'aurait pas d'impact sur l'amplification du virus en Camargue. Le virus serait transmis au cheval par *C. modestus* et *C. pipiens*. Ces résultats pourront permettre de mieux cibler la surveillance de cette maladie en France et d'appliquer des stratégies de contrôle plus adaptées à la situation locale.

Mots-clés : virus West Nile, épidémiologie, environnement, cheval, Camargue

Endemic transmission of West Nile Virus in equine population: identification of environmental risk factors in Camargue, France

Our objective was to assess risk of endemic circulation of the West Nile Virus (WNV) in horses in Camargue, where WNV caused several outbreaks (1962, 2000 and 2004). Epidemiology of WN disease is much complex, due to the great number of vector and host species potentially involved. Mainly transmitted by vectors, WNV circulation is deeply influenced by environmental factors. Horses were chosen as indicator of WNV circulation, because they are particularly sensitive to infection by this virus. The method applied in our studies is based on the use of direct link between environment and endemic circulation of WNV, by studying seropositivity in horses (IgG). In the first two studies, some environmental risk factors have been identified, such as land cover classes (heterogeneous agricultural areas, flooded vegetation) or landscape metrics (Interspersion and Juxtaposition Index). Risk map of endemic WNV circulation were computed for French Mediterranean coast. Individual risk factors, like breed, age and activity of horses were also identified. In the third study, WNV transmission processes in Camargue were assessed. In the study region, WNV would be introduced by migrating birds and amplified by *Culex modestus* and many competent bird species. Dilution effect would have no impact on WNV amplification in Camargue. WNV would be transmitted to horses by both *C. modestus* and *C. pipiens*. Our results could permit to target monitoring of this disease in France and apply control measures well adapted to local conditions.

Key-words : West Nile Virus, epidemiology, environment, horse, Camargue.