

BILAN D'UNE ÉTUDE DE SÉROPREVALENCE DES ORTHOFLAVIVIRUS WEST NILE, USUTU ET DU VIRUS DE L'ENCÉPHALITE À TIQUES SUR UN ÉCHANTILLON DE LA POPULATION ÉQUINE DE GIRONDE EN 2023

**THESE D'EXERCICE
pour obtenir le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR VETERINAIRE**

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université de Toulouse
par*

DE MAS Margaux, Arlette, Marie

Née le 10/06/2000 à TOULOUSE (31)

Directrice de thèse : Mme Elodie LALLEMAND

JURY

PRESIDENTE :
Mme Séverine BOULLIER

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

ASSESSEURES :
Mme Elodie LALLEMAND
Mme Aude FERRAN

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRES INVITEES :
Mme Marianne DEPECKER
Mme Camille MIGNE

Vétérinaire praticienne et associée de la Clinique Equine de Conques
Responsable adjointe du Laboratoire National de Référence West Nile de
l'ANSES

**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Liste des directeurs/assesseurs de thèse de doctorat vétérinaire

Directeur : Professeur Pierre SANS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, anatomie pathologique*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie, thérapeutique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et industrie des aliments d'origine animale*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, statistiques, modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie pathologique*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la reproduction, endocrinologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie médicale animale et comparée*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie vétérinaire*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des équidés et des carnivores*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et thérapeutique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation animale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, imagerie médicale*

PROFESSEURS 2^{ème} CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie-Thérapeutique*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la reproduction*
- Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et industrie des denrées alimentaires d'origine animale*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des équidés*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et mathématiques*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

MAITRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BRET Lydie**, *Physique et chimie biologiques et médicales*
- Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie, imagerie médicale*
- M. **COMBARROS Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie, bactériologie, pathologie infectieuse*
- Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
- M. **FERCHIOU Ahmed**, *Economie et gestion des entreprises vétérinaires agricoles*
- M. **FUSADE-BOYER Maxime**, *Microbiologie et infectiologie*
- M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, anatomie pathologique*
- Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
- Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie, analgésie*
- M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LE GRAVERAND Quentin**, *Alimentation animale*
- M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
- M. **OTAVIANO DO REGO Renato**, *Chirurgie*
- Mme **PIERRON Alix**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **TAHIR Zahid Muhammad**, *Reproduction des carnivores*
- M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire, maladies animales réglementées*
- Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

INGENIEURS DE RECHERCHE

- M. **AUMANN Marcel**, *Urgences, soins intensifs*
- M. **AUVRAY Frédéric**, *Santé digestive, pathogénie et commensalisme des entérobactéries*
- M. **CASSARD Hervé**, *Pathologie des ruminants*
- M. **CROVILLE Guillaume**, *Virologie et génomique cliniques*
- Mme **DIDIER Caroline**, *Anesthésie, analgésie*
- M. **DELPONT Mattias**, *Clinique Aviaire*
- Mme **DUPOUY GUIRAUTE Véronique**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- Mme **GAILLARD Elodie**, *Urgences, soins intensifs*
- Mme **GEFFRE Anne**, *Biologie médicale animale et comparée*
- Mme **GRISEZ Christelle**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **JEUNESSE Elisabeth**, *Bonnes pratiques de laboratoire*
- Mme **LAYSSOL-LAMOUR Catherine**, *Imagerie Médicale*
- Mme **POUJADE Agnès**, *Anatomie pathologique Vétérinaire*
- Mme **PRESSANTI Charline**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **RAMON PORTUGAL Felipe**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- M. **REYNOLDS Brice**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **ROUCH BUCK Pétra**, *Médecine préventive*
- Mme **SAADA Chloé**, *Gestion intégrée de la santé des ruminants*

REMERCIEMENTS

A mon jury de thèse,

A Madame la Professeure Séverine Boullier,

Professeure de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Praticienne hospitalière,

Immunologie générale et médicale,

Qui me fait l'honneur de présider mon jury de thèse. Pour ses enseignements et son encadrement bienveillant au cours de ces années d'études,

Sincères remerciements.

A Madame la Docteure Aude Ferran,

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Physiologie,

Qui me fait l'honneur de participer à mon jury de thèse. Pour sa gentillesse et ses enseignements au cours de ces années d'école,

Sincères remerciements.

A Madame la Docteure Elodie Lallemand,

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Praticienne hospitalière,

Chirurgie des équidés,

Qui a accepté d'être la directrice de mes travaux de thèse, et m'a accompagnée au cours de sa réalisation et de sa révision. Pour sa supervision, sa disponibilité et ses conseils avisés,

Reconnaissance et sincères remerciements.

A Madame la Docteure Marianne Depecker,

Vétérinaire praticienne et associée de la Clinique Equine de Conques,

Membre du Comité scientifique et de la commission Médecine Interne de l'AVEF (Association Vétérinaire Equine Française),

Spécialiste européenne en Médecine interne des équidés,

Qui a acceptée la direction de ma thèse et m'a offert l'opportunité de m'intégrer à ce projet de recherche et de participer à l'ensemble des étapes. Pour son engagement, sa bienveillance, sa disponibilité, sa confiance et ses précieux conseils,
Gratitude et sincères remerciements.

A Madame la Docteure Camille Migné,

Responsable adjointe du Laboratoire National de Référence West Nile de l'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail),

Chargée de projets en Virologie

Virologie,

Qui a généreusement contribué à l'élaboration de mon manuscrit. Pour son soutien désintéressé, son aide précieuse, sa bienveillance et sa disponibilité constante,
Profonde reconnaissance et sincères remerciements.

Je remercie également l'ensemble des personnes ayant contribué à ce travail,

A Madame la Docteure Noémie Chevalier,

Vétérinaire résidente en Médecine interne des équidés à la Clinique Equine de Conques,

Médecine interne des équidés,

Pour la réalisation de cet article et pour m'avoir gracieusement intégrée à son projet de résidence.

A Monsieur le Docteur Benoit Durand,

Chef de l'unité d'Epidémiologie de l'ANSES, (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail),

Epidémiologie, biostatistiques

Pour son aide précieuse dans l'analyse biostatistique des résultats.

A Monsieur le Docteur Clément Bigeard,

Inspecteur de santé publique vétérinaire à l'ANSES, (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail),

One Health et épidémiologie,

Pour son soutien enthousiaste et ses conseils dans la réalisation de mes travaux de thèse.

Au reste de l'équipe de l'enquête de séroprévalence 2023 en Gironde : Gaëlle Gonzalez (ANSES), Agnès Leblond (VetAgro-Sup), tous les vétérinaires référents et traitants impliqués,

Pour leur accueil au sein de l'équipe et la réalisation de ce projet porteur de sens.

A l'équipe de la Clinique Equine de Conques et ses internes de l'année 2023,

Pour leur accueil lors de mon passage en stage et leur partage.

A ma famille, sans laquelle je ne serais pas là aujourd'hui.

Pour votre soutien infailible et votre confiance inébranlable.

Table des matières

<i>Table des illustrations</i>	15
<i>Tableaux :</i>	16
<i>Liste des abréviations</i>	17
<i>Introduction</i>	20
1. Contexte, état des connaissances actuelles et objectifs de l'étude	21
1.1. Historique et contexte général en 2023	21
1.2. Les orthoflavivirus présents en France	22
1.2.1. Vue d'ensemble : Arboviroses et classification	22
1.2.2. Les orthoflavivirus : caractéristiques morphologiques et épidémiologiques	23
1.2.3. Les orthoflavivirus affectant les équidés.....	27
1.2.4. Les orthoflavivirus capables d'infecter les équidés présents en France métropolitaine au lancement de l'étude épidémiologique au printemps 2023 et leur répartition	33
1.3. Pathogénie des orthoflavivirus à l'origine d'encéphalites chez le cheval en France : WNV et TBEV	36
1.4. Des outils préventifs et thérapeutiques limités	39
1.5. Diagnostic	40
1.5.1. Diagnostic clinique.....	40
1.5.2. Diagnostic différentiel.....	42
1.5.3. Diagnostic biologique.....	47
1.5.4. Diagnostic histologique.....	51
1.5.5. Dépistage.....	51
2. Enquête 2023 sur le portage des arbovirus par les équidés en Gironde	55
2.1. Enjeux et objectifs de l'enquête	55
2.1.1. Des enjeux multiples en santé humaine et animale	55
2.1.1.1. Une maladie réglementée à potentiel zoonotique.....	55

2.1.2.	Objectif de l'enquête : une première documentation sur la circulation des orthoflavivirus dans le département de Gironde	57
2.2.	Matériel et méthodes	57
2.2.1.	Conception de l'étude.....	57
2.2.2.	Découpage de l'aire géographique de l'étude	58
2.2.3.	Méthodes d'échantillonnage et sites de prélèvement	62
2.2.4.	Critères d'inclusion des animaux prélevés	63
2.2.5.	Données additionnelles collectées.....	64
2.2.6.	Prélèvement et traitement des échantillons	64
2.2.7.	Analyses sérologiques réalisées par l'ANSES	64
2.2.8.	Analyses statistiques.....	68
2.3.	Résultats de l'enquête : prévalence des orthoflavivirus chez les équidés en Gironde.....	68
2.3.1.	Résultats de séroprévalence.....	69
2.3.2.	Analyses statistiques des facteurs de risque	73
3.	<i>Discussion des résultats, critiques de l'étude et perspectives pour l'avenir</i>	75
3.1.	Contextualisation des résultats de l'enquête épidémiologique de 2023 et limites d'interprétation	75
3.1.1.	Circulation des orthoflavivirus en 2023 en Gironde, comparaison avec d'autres publications	75
3.1.2.	Adéquation entre les zones de prélèvement et l'emplacement des sites positifs 79	
3.1.3.	Limite de l'interprétation temporelle des résultats.....	79
3.1.4.	Comparaison des facteurs de risques avec d'autres études sérologiques en fonction des conditions du milieu	80
3.1.5.	Les mécanismes expliquant l'émergence et l'expansion de WNV sur un territoire, application à la Gironde	82
3.2.	Critiques et perspectives pour l'avenir	87
3.2.1.	Représentativité de l'échantillon testé.....	87
3.2.2.	Perspectives d'amélioration	88
3.2.3.	Les orthoflavivirus : une maladie ré-émergente méritant une surveillance renforcée	90

3.2.3.1. En Gironde et en France : saison 2023 et mesures mises en place depuis notre étude	90
3.2.3.2. Enquêtes épidémiologiques et avancées scientifiques en France et à l'international en 2024.....	95
3.2.3.3. Bilan de la saison 2024 en France et en Europe.....	98
3.2.4. Les autres virus à considérer pour le futur en médecine vétérinaire équine ..	101
Conclusion	108
Bibliographie	112
Annexes	132
Annexe 1 : Seroprevalence of West Nile, Usutu and tick-borne encephalitis viruses in equids from south-western France in 2023, N. Chevalier & al., 24 av. 2025	132
Annexe 2 : Organigramme de classification des arbovirus (réalisation : Margaux De Mas)	144
Annexe 3 : Consentement éclairé utilisé au cours de l'enquête de séroprévalence	146
Annexe 4 : Flyer de communication utilisé au cours de l'enquête de séroprévalence	148
Annexe 5 : Questionnaire destiné aux détenteurs des équidés ayant participé à l'enquête de séroprévalence.....	150

Table des illustrations

Figures :

Figure 1 : Structure d'un virion du genre Orthoflavivirus (9).....	24
Figure 2: Structure de la polyprotéine des orthoflavivirus (9)	25
Figure 3 : cycle de réplication des orthoflavivirus (11)	26
Figure 4 : les cycles de transmission du virus de West Nile (3)	29
Figure 5 : Cycle de transmission du virus Usutu et espèces affectées (23).....	31
Figure 6 : Cycle de transmission du virus de l'encéphalite à tiques (16).....	32
Figure 7 : Bilan de la répartition des cas d'infection par le WNV en 2022 (34)	34
Figure 8 : Bilan de la répartition des cas d'infection par USUV chez les humains, oiseaux, équidés, moustiques et humains entre 2012 et 2021 en Europe, ECDC (35).....	35
Figure 9 : Bilan européen des cas confirmés d'encéphalite à tiques par pays, 2022, ECDC (1)	35
Figure 10: En France hexagonale : cas humains d'infection TBEV entre 2021 et 2023 (33).36	
Figure 11 : Schémas explicatifs de la pathogénie de l'infection par le WNV dans le cas de la forme neuroinvasive (36)	38
Figure 12 : Graphique de l'évolution dans le temps de la présence du virus ou des marqueurs d'infection virale dans les différents fluides de l'organisme infecté par le WNV (10)	48
Figure 13: Schéma de rappel sur les interactions Ac/Ag lors de la réponse immunitaire (40) 49	
Figure 14 : Principe de la technique d'amplification par PCR (Polymerase chain reaction) (43)	50
Figure 15 : Principe de trois méthodes d'ELISA pour la recherche d'anticorps sériques (64) 53	
Figure 16 : Comparaison des seuils de détection des différentes techniques de détection sérologique usuelles (40).....	55
Figure 17 : Les territoires de la Gironde (56).....	59
Figure 18 : Les aires protégées du département de Gironde (59)	60
Figure 19 : Les grands axes migratoires à l'échelle mondiale (A) (61) et en France (B) (62) 61	
Figure 20 : Localisation des écuries réparties sur les trois zones géographiques de l'étude. (63)	62
Figure 21 : schéma descriptif du principe du test sérologique ELISA "ID Screen Flavivirus competition" ND (Innovative Diagnostics, Montpellier, France) (Schéma : Margaux De Mas)	66

Figure 22 : schéma descriptif du principe du test de séroneutralisation utilisée, décrite dans l'étude de Beck et al. 2020 (69)	67
Figure 23 : Distribution des équidés séropositifs au WNV, USUV et/ou au TBEV dans les trois zones d'étude : Confluence, Arcachon et la zone intermédiaire en 2023 (63).....	73
Figure 24 : Cas équin d'infection West Nile rapportés au cours des saisons de transmission 2022 et 2023 (Crédit : Laboratoire National de Référence, (101))	92
Figure 25 : Cas d'infection par le virus Usutu au cours des saisons de transmission 2022 et 2023. (Crédit : Laboratoire National de Référence (61))	94
Figure 26 : Cas d'infection par le virus West Nile en 2024 pour les foyers/cas animaux et pour les cas humains dans les pays d'Europe (UE et voisins) (source : bulletins hebdomadaires Plateforme ESA) (124).....	98
Figure 27 : Cinétique de l'épidémie West Nile en France hexagonale en 2024 chez les équidés et oiseaux basée sur la date de début des symptômes (Données LNR West Nile).....	99

Tableaux :

Tableau 1 : Etiologie des affections neurologiques chez les équidés (38).....	43
Tableau 2 : Résultats de séroprévalence obtenus par test ELISA des chevaux échantillonnés dans les trois zones d'étude : Confluence, Arcachon et la zone intermédiaire.	70
Tableau 3 : Résultats de séroprévalence obtenus par séroneutralisation virale dans les trois zones d'étude : Confluence, Arcachon et la zone intermédiaire. (L'effectif "Non caractérisable" regroupe les échantillons positifs ou douteux par ELISA et négatifs par SNT)	71
Tableau 4 : Séroprévalence des différentes associations de statuts sérologiques obtenus par SNT pour WNV, USUV et TBEV	72
Tableau 5: Modèle de régression logistique à effets mixtes pour les statuts sérologiques obtenus par VNT concernant le WNV dans la zone de Confluence	75
Tableau 6 : Comparaison des résultats de séroprévalence dans différentes régions de France, d'Europe et du monde) (4, 69–80)	77

Liste des abréviations

AHSV : African horse sickness virus

AIE : Anémie infectieuse équine

ADN : acide désoxyribonucléique

Ag : antigène

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

APDI : arrêté préfectoral portant déclaration d'infection

ARN : acide ribonucléique

BAGV : Bagaza Virus

BODV-1 : Borna disease virus 1

BVDV : Bovine viral diarrhea virus

CHU : centre hospitalier universitaire

CHVE : centre hospitalier vétérinaire équin

CNR : Centre national de référence

ComERC : Comité d'éthique pour la recherche clinique

COVARS : Comité de Veille et d'Anticipation des Risques Sanitaires

DDPP33 : Direction départementale de la protection des populations de Gironde

DDETSPP : Direction départementale de l'emploi, du travail, des solidarités et de la protection des populations

DENV : Dengue virus

DGAL : Direction générale de l'alimentation

DGV : dépistage du génome viral

DIVA : differentiating infected from vaccinated animals

DMSO : diméthylsulfoxyde

DOM-TOM : départements d'outre-mer et territoires d'outre-mer

ECDC : European Center for Disease Prevention and Control

ECP : effet cytopathique

EEE : Encéphalite équine de l'Est

EEO : Encéphalite équine de l'Ouest

EEV : Encéphalite équine vénézuélienne

EFS : Etablissement français du sang

EHV-1 : Equine herpes virus 1

ELISA : Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay
ENVA : Ecole nationale vétérinaire d'Alfort
FCPR : formation complémentaire par la recherche
HCSP : Haut Conseil de la Santé Publique
HRP : horseradish peroxidase
IC : intervalle de confiance
ICTV : l'International Committee on Taxonomy of Viruses
IgG : immunoglobuline de type G
IgM : immunoglobuline de type M
IM : intramusculaire
ISPV : Inspecteur de santé publique vétérinaire
IV : intraveineux
JEV : Japanese encephalitis virus
LCR : liquide céphalo-rachidien
LIV : Louping Ill virus
LNR : Laboratoire national de référence
MAC ELISA : Immunoglobulin M antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay
MVEV : Murray Valley encephalitis virus
ND : nom déposé
OIE : Office international des épizooties
PACA : Provence-Alpes-Côte d'Azur
RESPE : Réseau d'épidémiosurveillance en pathologie équine
RT-PCR : Reverse-transcription - polymerase chain reaction
SLEV : Saint-Louis encephalitis virus
SNT : seroneutralisation test
TBE-complex : Tick-borne encephalitis complex
TBEV : Tick-borne encephalitis virus
TCID50 : 50% tissue culture infectious dose
USUV : Usutu virus
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
VSB-1 : Variegated Squirrel 1 Bornavirus
WNV : West nile virus
ZIKAV : Zika virus
ZPS : zone de protection spéciale

Introduction

Les arbovirus sont des virus transmis par des arthropodes comme les moustiques. Parmi les 500 arbovirus identifiés à ce jour, la moitié est transmise par des moustiques, le tiers par des tiques et le reste par des phlébotomes et des moucheron du genre *Culicoides* (1). Aujourd'hui, la répartition des arboviroses est mondiale et en expansion, dans le contexte du réchauffement climatique qui modifie les écosystèmes et la biologie des vecteurs. De plus, le caractère très souvent asymptomatique de ces infections, pour l'Homme comme pour l'animal, rend la surveillance délicate.

Le genre *Orthoflavivirus* regroupe un ensemble diversifié d'arbovirus. Certains sont responsables de troubles hémorragiques, et d'autres, comme les virus West Nile (WNV), Usutu (USUV) et de l'encéphalite à tiques (TBEV) ont un tropisme neurologique. L'importance de la forme clinique des maladies causées par ces derniers dépend de l'espèce touchée : ainsi, des symptômes peuvent être observés chez l'Homme suite à l'infection par les trois virus WNV, TBEV, et USUV dans une moindre mesure. En revanche, seules les infections par WNV et TBEV peuvent être symptomatiques chez les équidés.

Le virus du West Nile a été isolé en 1937 en Ouganda chez l'Homme, dans la région du West Nile. Des épidémies régulières chez l'Homme et les chevaux ont depuis été constatées sur les continents européen et africain, puis nord-américain depuis 1999. La France a elle-même connu plusieurs épisodes d'introduction et de (ré)-émergence du virus, notamment en Camargue en 1962 puis en 2000, 2004, dans le Var en 2003, dans le Gard et dans la région d'Argelès-sur-Mer en 2006 (2). Depuis, le virus circule de manière endémique dans le pourtour méditerranéen.

Cependant, aucun cas n'avait été recensé dans les autres régions françaises jusqu'en octobre 2022, où trois infections au WNV ont été signalées sur la côte Atlantique, en Gironde. Les équidés présentaient des symptômes neurologiques, tels qu'une ataxie, une faiblesse et des fasciculations musculaires, ainsi qu'une encéphalite pour un des chevaux. La réalisation de tests sérologiques avait révélé la mise en cause du WNV.

L'apparition d'une épidémie entraîne des conséquences importantes pour les régions touchées : d'une part économique pour la filière équine (mortalité importante, séquelles associées à la maladie) (Jeux Olympiques 2000), d'autre part, pour la santé humaine. En effet, la circulation croissante du virus au sein des populations animales constitue un signal d'alarme pour la santé humaine, plusieurs études ayant montré que l'analyse de la séroprévalence chez les chevaux permettait d'estimer le risque d'infection humaine (3).

Ainsi, l'émergence de maladies zoonotiques, et notamment celles provoquées par des orthoflavivirus dans des régions jusque-là indemnes inquiète, et motive la mise en place d'enquêtes épidémiologiques afin de mieux appréhender l'épidémiologie de ces pathogènes et leur évolution spatiale et temporelle à venir. Dans ce cadre, l'ensemble d'un réseau One Health a été mobilisé dans la région de Nouvelle-Aquitaine en 2023, initiant des études épidémiologiques parmi les populations d'équidés, mais aussi d'oiseaux, et d'insectes. Outre l'intérêt évident de cette étude en médecine vétérinaire, les équidés jouent un rôle efficace de sentinelles et de témoins de la circulation de ces orthoflavivirus zoonotiques, permettant ainsi d'anticiper d'éventuelles flambées épidémiques chez l'homme.

L'enquête de séroprévalence des orthoflavivirus dans la population équine de Gironde présentée dans cette thèse est le fruit de cette démarche. Mettant en jeu l'ensemble des acteurs du réseau One Health français, elle a ainsi pour objectif de caractériser quels orthoflavivirus circulent dans la population équine, ainsi que leur séroprévalence dans les zones à risque de la région bordelaise. Nous tenterons également d'identifier les facteurs de risque qui seraient favorables à l'infection d'un individu.

Après un état des connaissances actuelles concernant les orthoflavivirus, leur épidémiologie et répartition à différentes échelles, nous présenterons l'enquête menée en Gironde en 2023 et ses objectifs. Les résultats obtenus seront ensuite analysés et discutés, puis mis en relation avec le contexte et l'environnement de l'étude. Enfin, nous évoquerons les biais de l'étude et les perspectives de recherche à venir.

1. Contexte, état des connaissances actuelles et objectifs de l'étude

1.1. Historique et contexte général en 2023

L'existence de maladies virales vectorielles touchant l'Homme n'est pas récente : dès le début du XXème siècle, ces affections sont étudiées à travers les recherches sur la fièvre jaune chez l'Homme. Chez l'animal, la peste équine, virus vectorisé par les moucheron du genre *Culicoides*, a été découverte dès 1901 par MM. Fadyean, Nocard et Theiler. Depuis lors, de nombreux arbovirus, vectorisés par les moustiques mais aussi d'autres arthropodes comme les tiques (comme la maladie de Nairobi du mouton, mise en évidence en 1917 par Montgomery), n'ont cessé d'être découverts au fur et à mesure des recherches et avancées scientifiques permettant leur identification (4).

En effet, beaucoup d'arboviroses sont des zoonoses, c'est-à-dire des "maladies et infections qui se transmettent naturellement des animaux vertébrés à l'Homme et vice-versa" d'après l'Organisation Mondiale de la Santé (1959) (5). Le développement des connaissances à leur sujet constitue donc un enjeu capital pour la protection de la santé humaine, ce qui explique l'avancée rapide des recherches au niveau mondial.

Le cheval, mammifère domestique présent aux côtés de l'homme sur l'ensemble des continents et donc exposé à des vecteurs arthropodes multiples et variés, est sensible à plusieurs arbovirus, qui seront présentés ci-après. L'expression frustrée des maladies correspondantes et la faible spécificité des signes cliniques, principalement neurologiques, ont longtemps rendu difficile la mise en cause d'agents viraux. Ainsi, en Camargue dans les années 1960 où circulait le virus du West Nile, on parlait de cas de "lourdiges" en référence à la difficulté à se mouvoir de chevaux ataxiques, avec fréquemment, une parésie postérieure et une démarche ébrieuse (2).

En Europe, des virus appartenant au genre *Orthoflavivirus*, comme WNV et TBEV, sont régulièrement incriminés lors de la déclaration de cas graves d'encéphalites chez les chevaux, et ces infections correspondent fréquemment à l'apparition d'infections humaines concomitantes (6).

En France cependant, seul le virus du West Nile avait été mis en cause jusqu'à ce jour chez les équidés, et ce seulement sur le pourtour méditerranéen (1962 en Camargue, 2003 dans le Var, 2006 dans les Pyrénées-Orientales...) (5). Ainsi, plusieurs enquêtes sérologiques ont été menées en Camargue dans le cadre de cas déclarés d'infection par le virus du West Nile depuis 1963.

1.2. Les orthoflavivirus présents en France

1.2.1. Vue d'ensemble : Arboviroses et classification

Les arboviroses représentent un ensemble hétérogène de maladies dues à des arbovirus. Venant de l'abréviation de "arthropod-borne virus", ce terme désigne des virus "maintenus dans la nature par un cycle de transmission biologique entre des hôtes vertébrés permissifs et des arthropodes hématophages" (4), les vecteurs principaux étant les moustiques, les tiques, les moucheron du genre *Culicoides* et les phlébotomes. Il est important de souligner que dans le cycle des arbovirus, les arthropodes sont des vecteurs biologiques, en opposition au terme de vecteur mécanique (transmission passive par effet de "seringue souillée") : le virus connaît une phase de multiplication dans l'organisme de l'arthropode, sans modification de ses propriétés

(l'arthropode serait alors considéré comme un hôte intermédiaire). Cette définition, basée sur des critères épidémiologiques et non physico-chimiques, explique la diversité des espèces d'arbovirus (4).

Les virus de ce groupe hétérogène se caractérisent uniformément par une très faible résistance aux variations environnementales, ce qui rend obligatoire leur transmission directe *via* un arthropode vecteur. De plus, les espèces affectées sont très nombreuses et variées, les mammifères, reptiles, arthropodes et oiseaux étant tout autant concernés. Un autre critère nécessaire à l'inclusion d'une souche virale dans l'ensemble des arbovirus est la réussite des passages intracérébraux sur souriceaux nouveau-nés. La classification séro-immunologique de Casals et Brown, basée sur le caractère hémagglutinant et hémadsorbant, ainsi que sur le fait que l'infection par un arbovirus entraîne la synthèse d'anticorps neutralisants persistants plusieurs années, constitue un critère de classification majeur et précieux pour l'étude épidémiologique des arbovirus (4).

L'ensemble des arbovirus regroupe des virus appartenant à 10 familles virales différentes selon la classification taxonomique adoptée par l'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) : les *Asfarviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Nairoviridae*, *Peribunyaviridae*, *Phenuiviridae*, *Nyamiviridae*, *Rhabdoviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae* et *Togaviridae* (4, 6, 7).

Comme le met en lumière le diagramme de l'*Annexe 1*, la majorité des arbovirus connus à ce jour pour être responsables d'infection chez les équidés, en France, appartient au genre *Orthoflavivirus*, et pour l'ensemble, il existe un risque d'infection pour l'Homme. On distingue dans ce genre différents sérocomplexes au sein desquels les virus sont phylogénétiquement et antigéniquement très proches les uns des autres, comme le complexe du virus de l'encéphalite japonaise (JEV) qui regroupe WNV, USUV, JEV, le virus de l'encéphalite de la Murray Valley (MVEV) et le virus de l'encéphalite de Saint-Louis (SLEV), ou encore le complexe des encéphalites transmises par les tiques, dans lequel on retrouve TBEV et le virus de Louping Ill (LIV).

1.2.2. Les orthoflavivirus : caractéristiques morphologiques et épidémiologiques

Le genre *Orthoflavivirus* se classe au sein de la famille *Flaviviridae*. Ces derniers sont des virus enveloppés à ARN simple brin de polarité positive, linéaire, non segmenté. Les virions sont sphériques, d'une taille comprise entre 45 et 60 nm de diamètre, la nucléocapside est à

symétrie icosaédrique et porte plusieurs protéines de surface : les protéines E, prM, C (*Figure 1*) (4).

Le genre *Orthoflavivirus* plus précisément, anciennement *Flavivirus* renommé par l'ICTV en 2022 (7), compte actuellement 53 représentants. Les orthoflavivirus possèdent un génome d'environ 10 700 nucléotides (5), qui contrairement aux autres virus de la famille *Flaviviridae*, portent une coiffe nucléotide méthylée en son extrémité 5'.

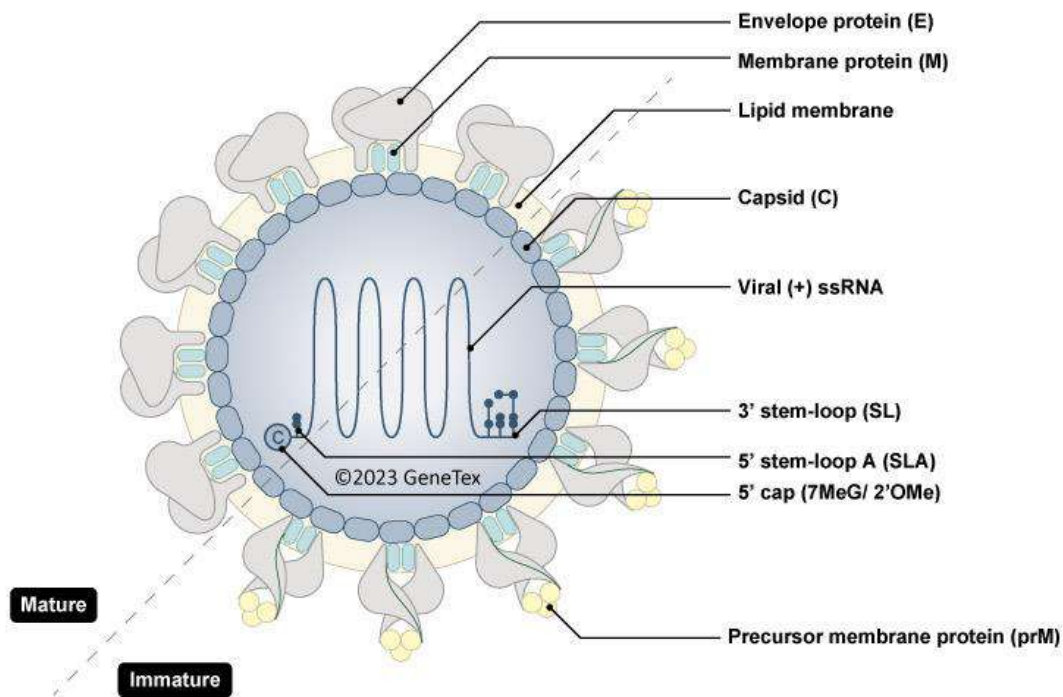


Figure 1 : Structure d'un virion du genre *Orthoflavivirus* (8)

L'enveloppe des orthoflavivirus est un assemblage complexe des trois protéines virales structurales E, prM, C associées à des particules provenant de la cellule hôte, intégrés lors du passage et de la maturation du virion dans le système endomembranaire cellulaire.

La glycoprotéine d'enveloppe E est la plus antigénique des orthoflavivirus, elle est donc utilisée dans le cadre du diagnostic d'infection aux orthoflavivirus et du développement de vaccins. Sa structure tertiaire est constituée de trois domaines : DI, DII et DIII. La plupart des épitopes B localisés sur DI et DIII sont communs aux souches de WNV mais sont distincts des autres orthoflavivirus. En effet, le DIII présente une séquence moins conservée entre ces virus et induit des anticorps fortement neutralisants. En revanche, les épitopes reconnus par les anticorps responsables des réactions croisées entre orthoflavivirus sont localisés au niveau de DII (9).

Le cycle de réplication des orthoflavivirus, très similaire à celui des hepacivirus, commence par leur entrée dans la cellule cible par endocytose, grâce à la liaison de la glycoprotéine E à des récepteurs cellulaires. Le virus est alors pris en charge dans une vésicule endosomale, dans laquelle le pH acide va provoquer une fusion de la membrane endosomale avec l'enveloppe virale et ainsi un relargage du génome viral dans le cytosol (10). L'ARN viral positif est alors directement traduit en une polyprotéine unique, qui est ensuite scindée en 10 protéines virales fonctionnelles : les protéines structurales E, prM et C et 7 protéines non structurales NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 (*Figure 2*) (5, 11).

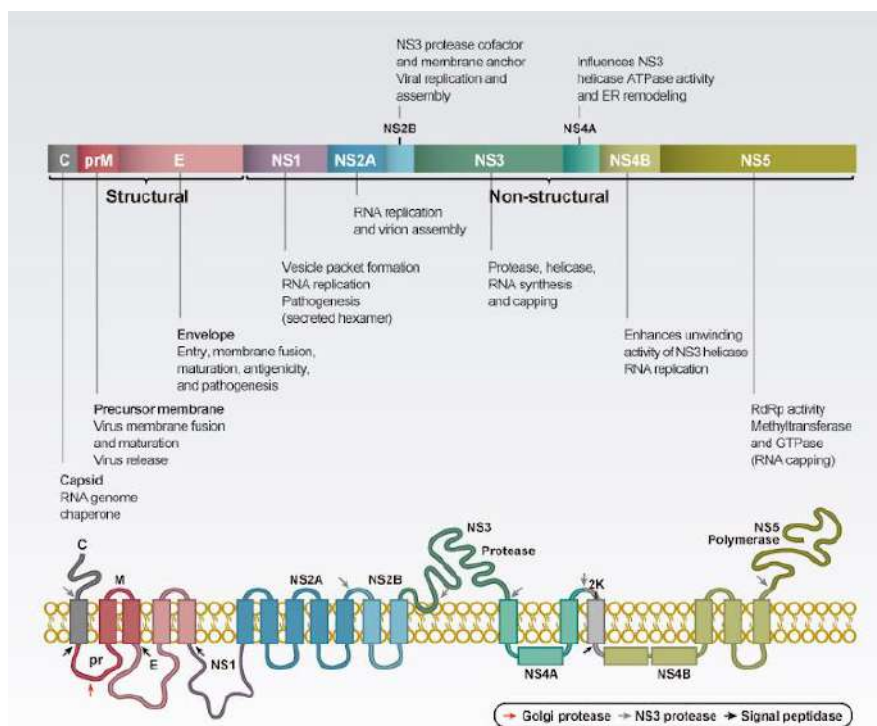


Figure 2: Structure de la polyprotéine des orthoflavivirus (8)

Cette maturation de la polyprotéine virale nécessite l'intervention de protéases cellulaires mais également de protéases codées par le génome viral : chez les orthoflavivirus, il s'agit de la protéase NS3 associée au co-facteur NS2B (12). Les orthoflavivirus codent leur propre ARN-dépendante-ARN-polymérase, qui va alors copier le génome viral en ARN-intermédiaire, matrice pour la réplication de tous les ARN viraux dans le réticulum endoplasmique de la cellule hôte. Les virions immatures formés y sont liés aux proto-protéines prM et E, avant d'être acheminés vers l'appareil de Golgi où des remaniements protéiques vont permettre la maturation finale des virions. Finalement, les virions matures sont transportés par

des vésicules jusqu'à la membrane cytoplasmique où ils sont exocytés dans le milieu extracellulaire, selon un cycle non lytique (*Figure 3*).

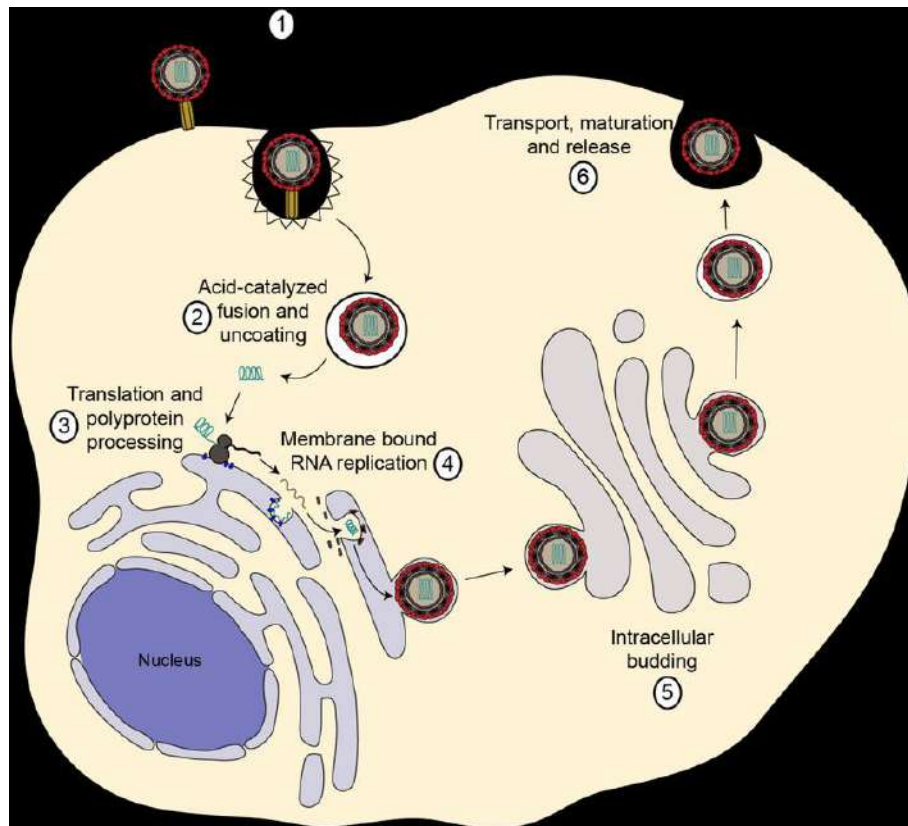


Figure 3 : cycle de réplication des orthoflavivirus (10)

De façon générale, le cycle naturel de transmission des orthoflavivirus est commun avec les autres arbovirus : hôtes réservoirs et/ou amplificateurs, vecteurs arthropodes et hôtes définitifs pouvant être des culs-de-sacs épidémiologiques ou des relais amplificateurs, selon si la virémie est suffisamment élevée à un stade de l'infection pour permettre l'infection d'un vecteur (5).

Le réservoir est l'hôte naturel idéal de l'arbovirus : il est réceptif à l'infection mais ne développe pas de signe clinique. Cependant, le stade de virémie est intense et prolongé, ce qui permet la transmission du virus aux vecteurs. Chez les orthoflavivirus d'importance en santé animale, les espèces réservoirs peuvent être des oiseaux, des rongeurs... Les hôtes définitifs exprimant une virémie élevée peuvent également jouer le rôle d'amplificateurs, ainsi que certains vecteurs capables de transmission ovarienne du virus, comme les tiques. Les vecteurs des orthoflavivirus sont des arthropodes piqueurs hématophages, principalement les moustiques et les tiques (13). Pour un virus donné, on identifie des espèces d'arthropodes dites vecteurs

habituels, et d'autres vecteurs dits accessoires qui interviennent de façon minoritaire, mais qui peuvent expliquer l'extension du spectre d'hôtes à des hôtes accidentels, comme cela sera exposé plus tard. Cette différenciation découle de plusieurs critères : degré de sensibilité et seuil de multiplication du virus permettant sa transmission (compétence vectorielle), longévité, abondance régionale à corrélée à la densité d'hôtes dans cette même région, et appétence particulière pour une espèce réservoir ou victime (capacité vectorielle). La transmission est de type biologique, avec une infectiosité prolongée, pouvant être interrompue en diapause hivernale et parfois complétée par une transmission verticale à la descendance chez les tiques (5).

Au contraire de l'espèce hôte, l'espèce hôte définitive, ou victime, est réceptive et sensible à l'infection : la virémie est éphémère et des signes cliniques peuvent être observés. Dans le cas des orthoflavivirus, les hôtes définitifs sont principalement des mammifères (dont l'Homme très souvent), mais le spectre d'hôtes peut s'étendre à de très nombreuses espèces différentes. De fait, on retrouve le virus du West Nile également chez des reptiles et amphibiens (2).

Certains orthoflavivirus ont un tropisme nerveux central (West Nile, TBEV, encéphalite japonaise, encéphalite de Saint Louis, Usutu...), tandis que d'autres ont un tropisme viscéral (Dengue, fièvre jaune). Ainsi, selon le virus, la maladie peut se présenter sous forme de fièvre hémorragique ou de méningo-encéphalite potentiellement mortelle (5, 14).

De façon inhérente à la nature de ce cycle, les maladies dues aux arbovirus, et donc à notre genre d'intérêt *Orthoflavivirus*, sont des maladies saisonnières sous la dépendance de la présence des arthropodes vecteurs et donc des conditions environnementales et climatiques favorables à leur développement et à leur rencontre avec les hôtes. Par exemple, en été, la probabilité de rencontre entre les réservoirs oiseaux et les moustiques est renforcée par la concentration des populations autour des rares points d'eau (2).

1.2.3. Les orthoflavivirus affectant les équidés

Les équidés sont surtout sensibles à des orthoflavivirus à tropisme nerveux. En Europe, ce sont des infections par les virus du West Nile (WNV), les virus du complexe de l'encéphalite à tiques (TBEV), ainsi que le virus Usutu (USUV), qui sont majoritairement décrites parmi les populations équines d'après le rapport du Collège Européen de Médecine interne équine de 2022 (15–17). D'autres orthoflavivirus circulent également dans le reste du monde, comme le virus de l'encéphalite japonaise (JEV) en Asie du Sud Est, et le virus de la Murray Valley

(MVEV) en Australie et Nouvelle-Guinée. (*Figure 4*). Ces derniers virus n'ont pas encore été impliqués des cas humains et équins en Europe, mais ils ont été détectés dans le nord de l'Italie chez des moustiques et oiseaux en 2011 (18).

Le **virus du West Nile (WNV)** d'abord, responsable de symptômes neurologiques sévères autant chez le cheval que chez l'homme, est l'arbovirus responsable d'encéphalite équine le plus largement répandu (16). Il est majoritairement vectorisé par les moustiques du genre *Culex* (*C. pipiens pipiens*, le moustique "commun" et *C. pipiens molestus* sur le territoire métropolitain français), bien que sa spécificité vectorielle soit toute relative : en effet, d'autres vecteurs minoritaires ou opportunistes tels que les moustiques du genre *Aedes* (*Ae. cantans*, *Ae. caspius*), ou des tiques des genres *Argas* ou *Hyalomma* pourraient aussi transmettre le virus (4, 19, 20). Le spectre d'hôtes du WNV est extrêmement large : ayant pour réservoir principal les oiseaux, le WNV est aussi capable d'infecter des mammifères, mais également des reptiles et des amphibiens. Cela est lié aux caractéristiques différentes des nombreux vecteurs possibles : si les principaux vecteurs, les moustiques *Culex*, sont surtout ornithophiles en France, le genre *Aedes*, plutôt mammophile non strict, serait à l'origine de la transmission du virus aux mammifères : c'est ce que l'on appelle des "vecteurs-ponts". Parmi les espèces d'oiseaux, les corvidés sont les plus sensibles, et révèlent ainsi la présence du virus sur un territoire. L'infection d'oiseaux migrateurs explique quant à elle l'expansion transcontinentale du WNV participe sans doute à son émergence dans des aires géographiques jusque-là indemnes. Dans ce cycle, l'Homme et les équidés sont considérés comme des hôtes culs-de-sacs épidémiologiques, ils ne participent pas au cycle naturel de transmission. En effet, ils ne développent pas une virémie suffisante pour être à l'origine de l'infection de moustiques lors de repas sanguins. Dans ce cycle faisant déjà intervenir un grand nombre d'acteurs, des mécanismes considérés plus anecdotiques sont évoqués, tels que la survie du virus pendant l'hiver au sein du vecteur, une transmission verticale possible entre moustiques, ou encore la transmission directe entre oiseaux, par voie oro-fécale (*Figure 4*) (2). Chez l'Homme, une transmission interhumaine peut s'opérer lors de don de sang et de transplantation d'organes.

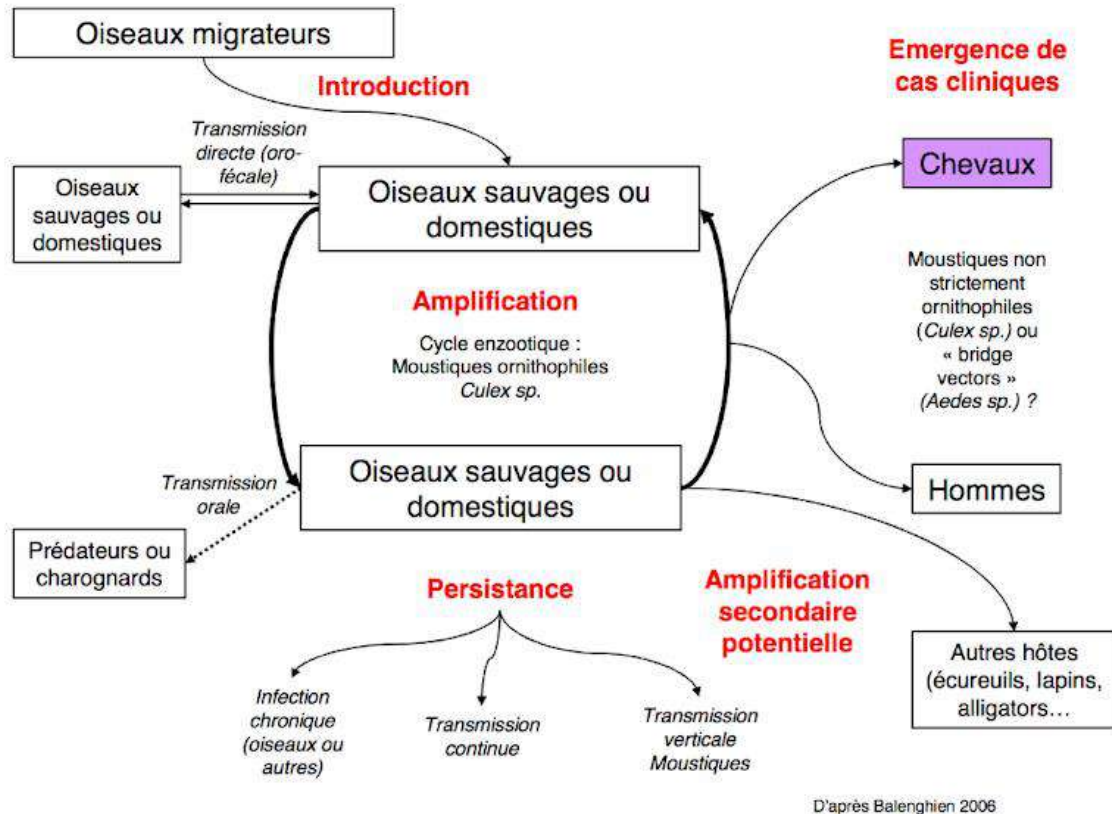


Figure 4 : les cycles de transmission du virus de West Nile (2)

Différentes lignées virales ont été caractérisées : la lignée 1, la plus répandue, est retrouvée notamment en Europe et aux Etats-Unis, mais aussi en Afrique, au Moyen-Orient, en Inde ou en Australie. La lignée 2 n'était trouvée originellement qu'en Afrique subsaharienne ou à Madagascar. Sur les neuf lignées génétiques décrites, les lignées virales 1 et 2 sont celles qui représentent un risque zoonotique le plus important et qui sont incriminées dans les cas symptomatiques chez les hommes, chevaux et oiseaux (4). Il semblerait qu'une importante variabilité de la séquence de la glycoprotéine virale E soit en partie responsable de la neurovirulence et du potentiel invasif du virus du West Nile (16). Le WNV circule en Europe depuis les années 1960, on le trouvait alors en France, au Portugal ou à Chypre. Après une trentaine d'années de silence, la lignée 1A du WNV a refait surface en Afrique du Nord et en Europe, notamment dans la région française de Camargue en 2000. Si aux Etats-Unis, le WNV s'est déclaré sous forme d'épidémie fulgurante et d'une ampleur massive après son introduction à New York en 1999, le scénario européen est différent : depuis une vingtaine d'années, des épidémies imprévisibles, mais limitées dans l'espace et dans le temps, touchent le pourtour méditerranéen et l'Europe de l'Est avec une fréquence néanmoins croissante. Cette allure épidémiologique différente peut être liée aux multiples modalités de transmission du WNV :

une transmission directe entre oiseaux expliquerait la diffusion rapide observée aux Etats-Unis, tandis qu'une épizootie/épidémie plus concentrée et de faible ampleur serait attribuée à une transmission du virus par les vecteurs arthropodes. Plus récemment, l'expansion du WNV a connu un nouvel essor avec l'introduction en Europe du lignage 2, vraisemblablement originaire d'Afrique, qui s'est répandu depuis les pays d'Europe de l'Est (Hongrie, Autriche) vers le reste du continent, notamment en Grèce ou en Italie en 2011, en Espagne en 2017, et même plus récemment en Allemagne et même en France en 2018 (3, 21).

Les humains et les équidés sont les deux espèces de mammifères les plus sensibles à l'infection par le WNV (4). Si dans la majorité des cas, l'infection est asymptomatique chez ces deux espèces, les équidés développent des signes cliniques dans jusqu'à 10% des cas. De même, 1 cas humain sur 140 présente une atteinte neurologique grave (16). Ce sont souvent des patients immunodéprimés, qui ont alors 80% de risque de développer une forme sévère. Cela justifie que la fièvre du West Nile soit classée comme danger sanitaire de catégorie E par la loi de santé animale en Europe, et donc soumise à déclaration et surveillance (règlement (UE) 2016/429, 2021).

D'autre part, le **virus Usutu (USUV)**, jamais décrit comme étant à l'origine de signes cliniques chez le cheval, a été isolé dans des cas de symptômes neurologiques chez l'Homme. Isolé en 1959 en Afrique sub-saharienne, il a été introduit en Europe en 1996, où il fait l'objet de programmes de surveillance renforcés. Le virus USUV se caractérise par ailleurs par une grande diversité génétique : on dénombre à ce jour 5 lignées européennes et 3 lignées africaines. Le cycle de transmission naturelle du virus Usutu implique les moustiques (*Culex spp.*) comme vecteurs biologiques, et les oiseaux comme hôtes amplificateurs et réservoirs, notamment les passereaux. De même que pour le WNV, l'homme et d'autres espèces de mammifères constituent des hôtes culs-de-sacs épidémiologiques (*Figure 6*). Certaines espèces de mammifères, comme le chien et le cheval, ne développent que de façon exceptionnelle des symptômes et l'historique d'un contact avec le virus n'est visible que sérologiquement. Cependant, USUV est responsable de forte mortalité chez certaines espèces aviaires comme les merles et les chouettes laponnes. Chez l'Homme, le neurotropisme du virus engendre des signes neurologiques graves et explique la considération et l'inquiétude en regard du USUV, d'autant plus que la co-circulation de plusieurs lignées virales sur un même espace et le caractère asymptomatique de l'infection chez plusieurs espèces compliquent la surveillance et le contrôle (22).

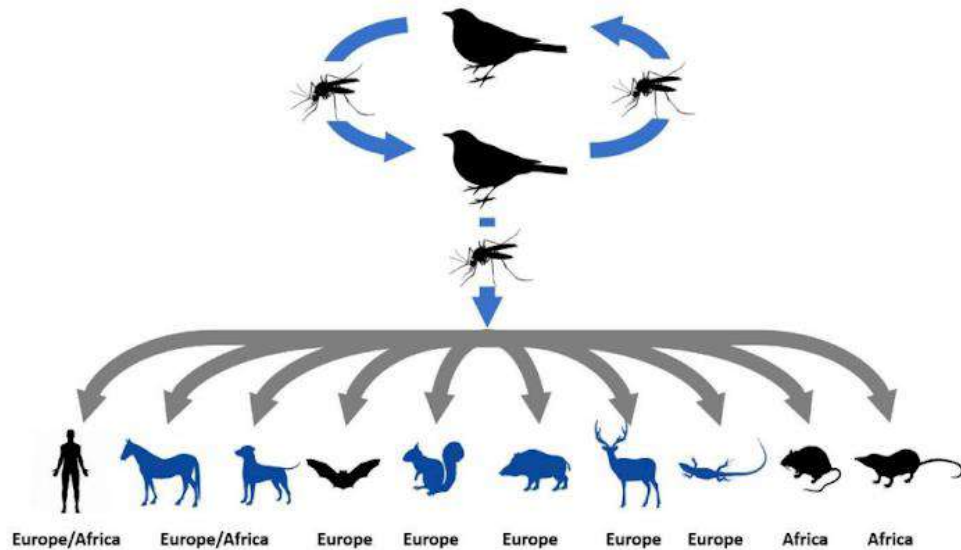


Figure 5 : Cycle de transmission du virus Usutu et espèces affectées (22)

Le virus Usutu a été isolé chez les espèces en noir, tandis que des individus sérologiquement positifs ont été mis en évidence chez les espèces en bleu.

Le **virus de l'encéphalite à tiques** (TBEV : tick-borne encephalitis virus) est également un orthoflavivirus capable d'infecter les équidés. Il est inclus plus largement dans le sérocomplexe TBE, tout comme le virus Louping Ill (LIV), responsable de l'encéphalomyélite ovine et capable d'affecter de façon plus anecdotique d'autres mammifères, dont l'homme, le cheval, les bovins, certains rongeurs... Contrairement au WNV et au USUV, le TBEV est transmis par des tiques dures : *Ixodes ricinus* est le principal vecteur en Europe de l'Ouest, mais 14 espèces de tiques peuvent être infectées (*I. persulcatus* en Europe du Nord et de l'Est) (15). Les petits rongeurs constituent le principal réservoir du virus. Les tiques constituent également un réservoir du virus. Lorsqu'une tique au stade larvaire se gorge sur un rongeur virémique, elle restera infectée tout au long de sa vie. Le virus est maintenu lors des différentes mues (transmission trans-stadiale), et une transmission transovarienne a été décrite (de la tique adulte femelle à sa descendance). Les virus du TBE-complex ont aussi été isolés dans le lait de mammifères infectés : la consommation de lait ou de produits laitiers non pasteurisés est également une voie de contamination (Figure 7). Divisé en cinq souches virales différentes, le TBEV est largement distribué sur l'ensemble des territoires eurasiatiques, où on recense plus de 10 000 cas humains par an (23). Tout comme la fièvre West Nile, l'infection des humains et des équidés par le TBEV est généralement asymptomatique, mais dans une minorité de cas, la maladie peut évoluer vers un état fébrile et des symptômes neurologiques sévères (4). Ainsi, une étude rétrospective menée en Suisse entre 2011 et 2019 a mis en évidence l'implication du

TBEV chez 6 chevaux atteints de symptômes neurologiques aigus, dont une ataxie et des déficits proprioceptifs (24). D'autres publications rapportent l'existence de cas cliniques équins dans les régions endémiques du virus, comme en Autriche ou en Allemagne (25, 26).

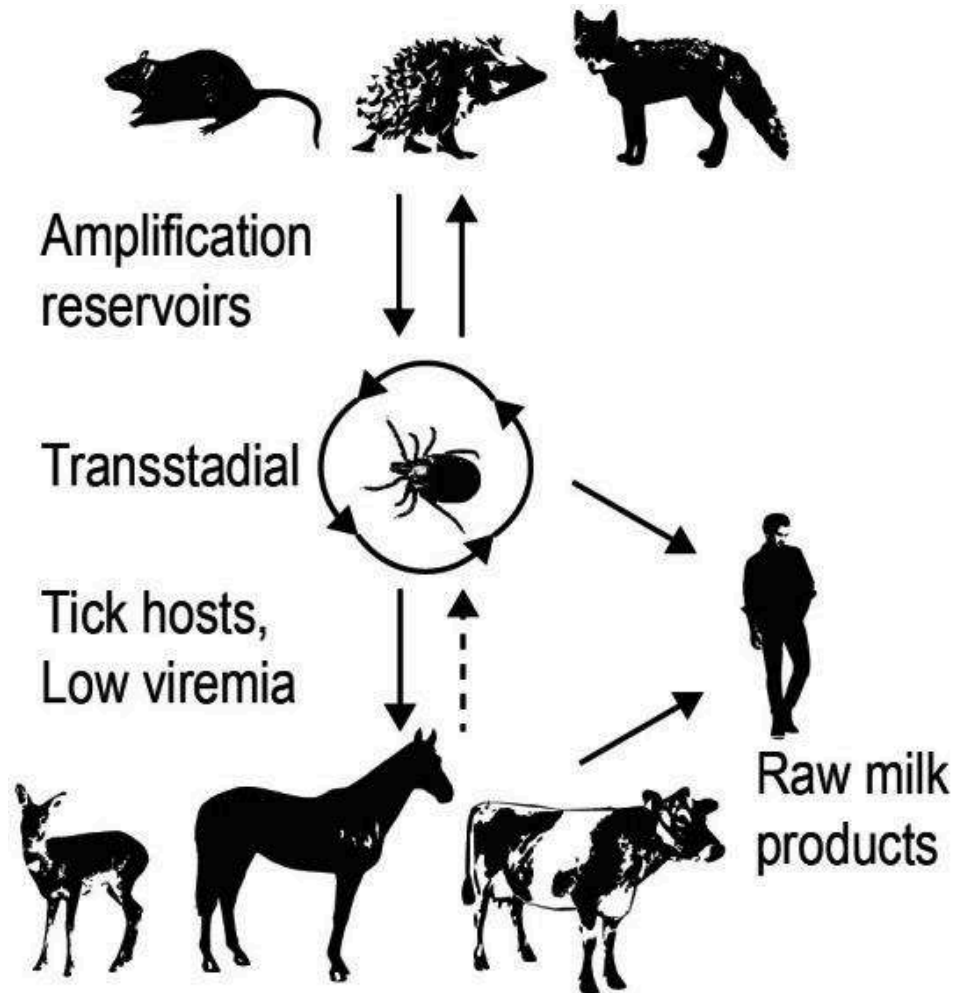


Figure 6 : Cycle de transmission du virus de l'encéphalite à tiques (15)

Le **virus de l'encéphalite de la vallée de Murray (MVEV)** a été isolé pour la première fois en 1951 dans la vallée de Murray, en Australie. Responsable d'épidémies mortelles chez l'homme associées à des symptômes sévères (fièvre, vomissements, diarrhée, céphalées, encéphalite voire mort), le virus infecte également les animaux domestiques par la piqûre de moustiques des genre *Culex*, *Anopheles* et *Aedes*. Cependant, seul le cheval présente des signes cliniques. Dans ce cas encore, les oiseaux sauvages, et surtout les oiseaux d'eau, sont les principaux hôtes réservoirs du virus, mais le porc, le lapin et le kangourou peuvent également jouer ce rôle (4).

Le **virus de l'encéphalite japonaise (JEV)**, comme le West Nile, est classé comme danger sanitaire de catégorie E en Europe, soumis à déclaration et surveillance. C'est en effet une zoonose grave responsable de pertes économiques importantes en élevage porcin. Il existe 5 génotypes, les plus répandues étant les génotypes I et III en Asie du Sud-Est, région où il est décrit pour circuler. En 2022, de manière inattendue, le génotype IV a été introduit en Australie où des cas porcins et chez des alpagas ont été rapportés (27). Également transmis par les moustiques du genre *Culex*, JEV possède un cycle épidémiologique très proche de celui du virus du West Nile, à ceci près qu'il infecte également les porcs, et que ceux-ci sont des hôtes amplificateurs pouvant être à l'origine de l'infection de nouveaux moustiques. L'encéphalite japonaise est majoritairement asymptomatique dans l'espèce porcine même si elle peut causer des avortements chez les truies gestantes. En revanche, elle provoque des signes cliniques similaires au West Nile chez les humains et les équidés infectés. Il est à noter qu'un vaccin contre cette maladie existe et est disponible dans les régions d'Asie où le virus circule (5).

Si dans le contexte actuel du réchauffement climatique et du chamboulement global des conditions climatiques et environnementales mondiales, il faut s'attendre à des émergences virales inattendues sur des territoires à ce jour indemnes, les connaissances actuelles et les études menées jusqu'à maintenant permettent de donner une idée de la distribution géographique des différentes espèces d'orthoflavivirus dans le monde, et plus spécifiquement des souches virales circulant en France hexagonale.

1.2.4. Les orthoflavivirus capables d'infecter les équidés présents en France métropolitaine au lancement de l'étude épidémiologique au printemps 2023 et leur répartition

Pour résumer, les orthoflavivirus WNV, USUV ainsi que le TBEV ont été identifiés en Europe et plus précisément en France hexagonale chez les populations d'équidés. Avant le signalement de trois cas de West Nile chez des chevaux en Gironde en octobre 2022, la lignée 1a du WNV mais aussi la lignée 2, ne concernait que le bassin méditerranéen (Camargue, Hérault, Bouches-du-Rhône, Var, Pyrénées Orientales) (*Figure 7*) (28). Quant au USUV, sa présence n'avait pas été reportée en France jusqu'en 2015 dans les régions du Rhône et du Haut-Rhin, où une importante mortalité parmi les populations d'oiseaux a révélé sa présence sur le territoire. En 2016, le premier cas humain a été recensé en Camargue. D'après les enquêtes épidémiologiques réalisées depuis, les lignées Africa 2 et 3 et Europa 3 circulent sur une large

portion du territoire français, avec un record de circulation dans l'avifaune en 2018 où plus d'une centaines de cas aviaires répartis sur 47 départements ont été rapportés (22, 29). En octobre 2022, un cas humain a été confirmé en Nouvelle-Aquitaine pour la première fois (30). Concernant l'infection des chevaux par le virus Usutu, les enquêtes sérologiques menées dans le Bassin Méditerranéen sur le virus du West Nile ont révélé une co-circulation du virus Usutu, sans déclaration de cas cliniques (*Figure 8*). Le virus TBEV est endémique chez les équidés dans plusieurs pays d'Europe, tels que la Lituanie, l'Allemagne, l'Autriche la Suisse où des séroprévalences inattendues ont été trouvées (entre 20 et 30%) (31). En France, des cas humains pour la plupart autochtones, recensés entre 2021 et 2023 en Haute-Savoie, Alsace, et Auvergne-Rhône-Alpes témoignent de la circulation active du virus sur le territoire français (*Figure 9*, *Figure 10*) (32). Cependant, le TBEV n'a pas encore été détecté chez les chevaux, son absence a même été objectivée lors de l'enquête épidémiologique sur la présence des virus WNV et USUV menée en 2022 dans le Sud-Est de la France (28).

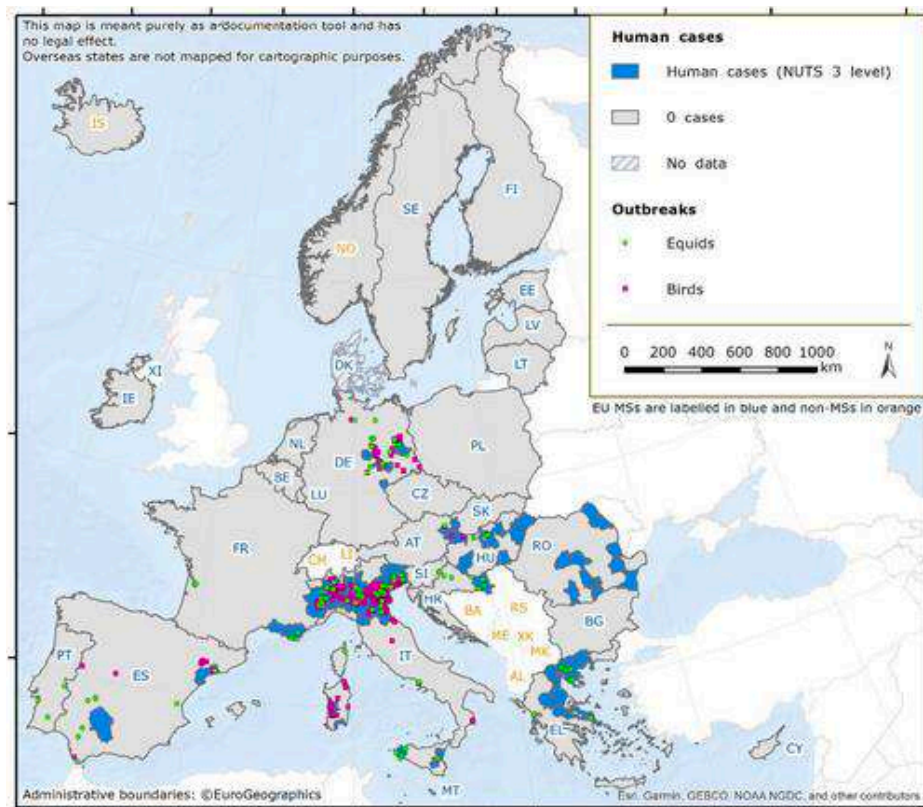


Figure 7 : Bilan de la répartition des cas d'infection par le WNV en 2022 (33)

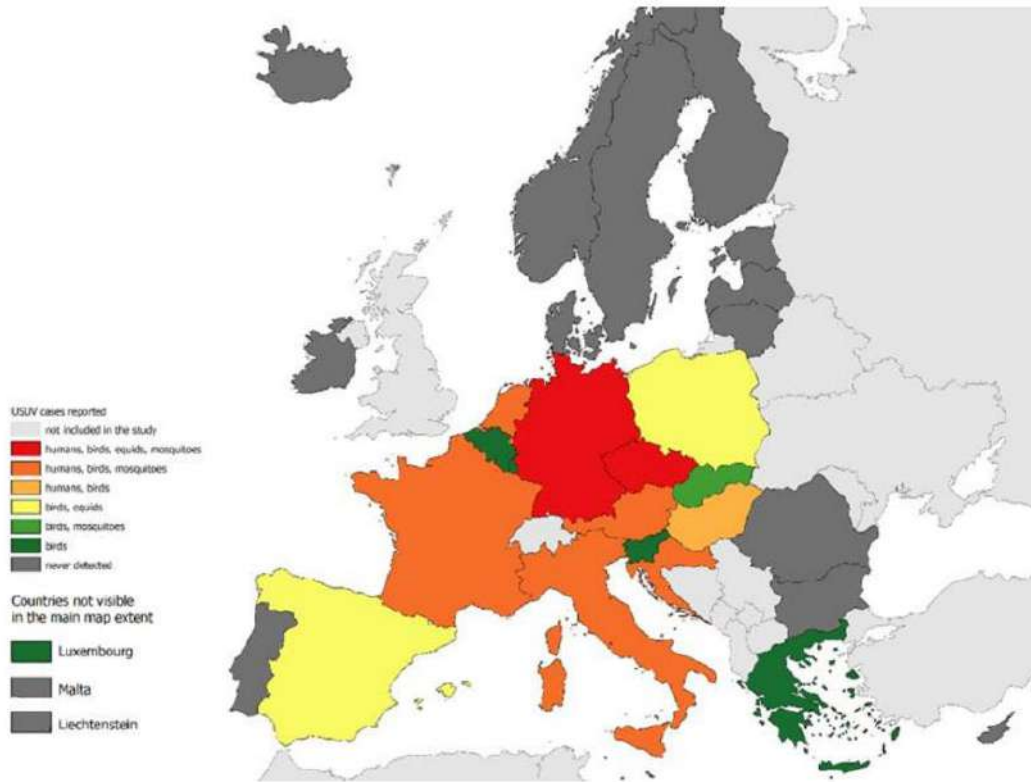


Figure 8 : Bilan de la répartition des cas d'infection par USUV chez les humains, oiseaux, équidés, moustiques et humains entre 2012 et 2021 en Europe, ECDC (34)

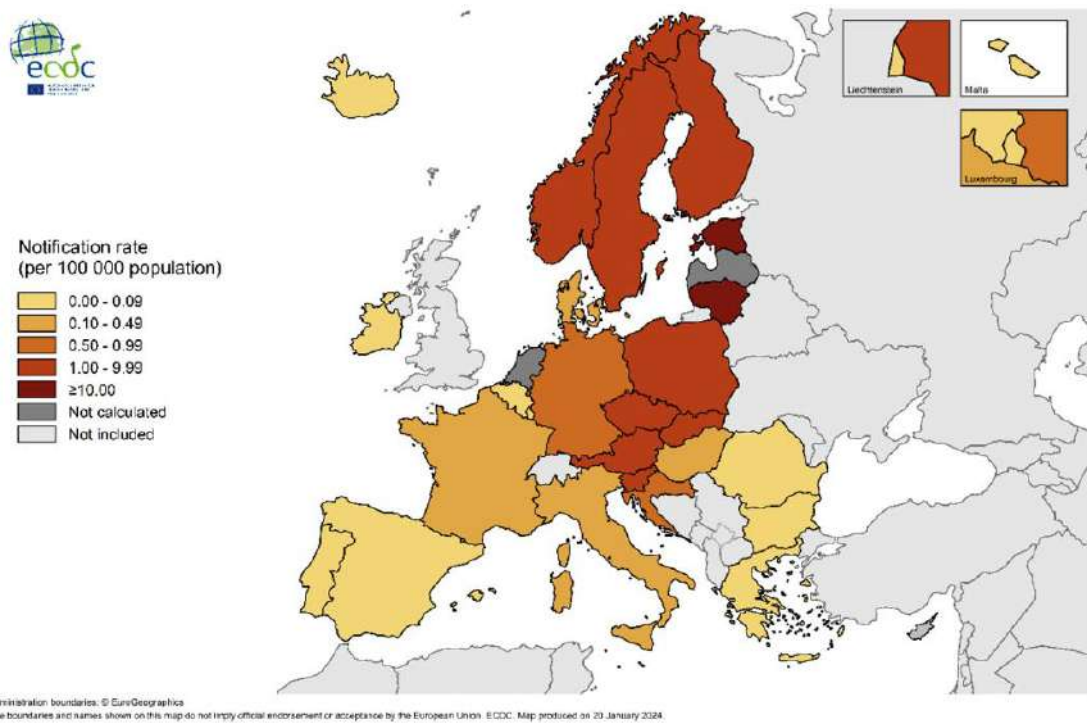


Figure 9 : Bilan européen des cas confirmés d'encéphalite à tiques par pays, 2022, ECDC (35)



Figure 10: En France hexagonale : cas humains d'infection TBEV entre 2021 et 2023 (32)

Nous verrons par ailleurs que certaines enquêtes épidémiologiques menées à ce jour, dont celle sur laquelle porte ce travail, révèlent la circulation possible chez les chevaux de nouveaux orthoflavivirus encore non caractérisés sur le territoire français (28).

1.3. Pathogénie des orthoflavivirus à l'origine d'encéphalites chez le cheval en France : WNV et TBEV

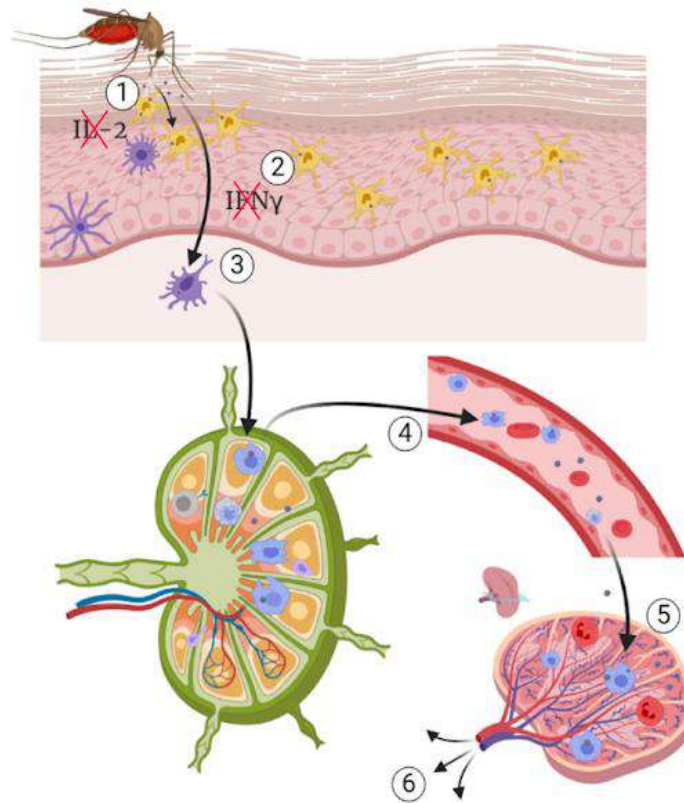
La pathogénie de ces orthoflavivirus est similaire et est caractérisée par une réplication initiale extra-neuronale, puis par une invasion du système nerveux central via la barrière hémato-méningée (36). De nombreuses zones d'ombre persistent, mais les recherches avancent et donnent de plus en plus de précisions sur les mécanismes d'action du virus. Dans la suite de ce paragraphe, le mode d'action du WNV est développé et pris comme exemple. Suite à la piqûre du moustique infecté, le virus se réplique localement dans les kératinocytes et les cellules de Langerhans de l'épiderme au niveau du site d'injection. Cette réplication locale est favorisée par l'effet immunomodulateur de la salive du moustique, qui perturbe le signalement et le recrutement des premiers acteurs de l'immunité innée par les cytokines (interleukine 2, interféron Gamma) (Figure 11). Les cellules de Langerhans infectées migrent ensuite jusqu'aux

nœuds lymphatiques drainant la zone correspondante, où le virus poursuit sa multiplication. Là, l'immunité innée joue son rôle de lutte contre l'infection par phagocytose des cellules infectées et des particules virales libres, ou via la sécrétion de chimiokines. Cependant, le virus continue de se répliquer dans les cellules dendritiques du nœud lymphatique simultanément à l'action de lutte des macrophages. Depuis le système lymphatique, le virus se répand ensuite par voie hématogène dans le reste de l'organisme. De cette infection généralisée découlent ensuite les différentes formes cliniques observables : la forme neuroinvasive rapportée chez beaucoup d'espèces hôtes, mais aussi des formes gastro-intestinales, hépatiques, pancréatiques, cardiovasculaires ou cutanées chez l'humain notamment.

Concernant la forme neuroinvasive, plusieurs scénarios sont avancés pour expliquer les voies d'infection du tissu nerveux par le virus. La première hypothèse avancée est la voie hématogène, avec un transfert passif du virus à travers la barrière hémato-méningée favorisé par le contexte inflammatoire et la perméabilité vasculaire plus importante associée. Le mécanisme du "Cheval de Troie" est également évoqué par certaines études : il fait référence à un mécanisme décrit dans l'infection par le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV). Le virus atteindrait alors le cerveau par le recrutement de leucocytes périphériques infectés dans le système vasculaire cérébral. Finalement, l'autre scénario recevant le plus de considération est la voie trans neuronale : le virus migrerait depuis son point d'entrée - les nerfs somatiques périphériques ou les nerfs sensitifs - via les nerfs moteurs et sensitifs par transport axonal, jusqu'au système nerveux central. La parésie postérieure observée chez les chevaux infectés résulterait des dommages causés au cours de cette migration trans neuronale à travers la moelle épinière de la région lombo sacrée (L5-S1).

Il est à noter que la forme rénale est également observée chez les équidés, le plus souvent en association avec la forme neuroinvasive, sans que les mécanismes associés ne soient encore clairs.

Les séquelles régulièrement signalées après la guérison peuvent en partie s'expliquer par une surexpression continue et un dérèglement de la régulation des gènes codant pour les cytokines inflammatoires, qui ont pour conséquences des processus inflammatoires incontrôlables parfois mortels, mais qui sont aussi propices au développement d'immunopathologies (*Figure 11*) (37).



Pathogénie de l'infection par le WNV. (1) *Culex quinquefasciatus* transmettant le WNV par sa salive infectante à un hôte sensible, durant un repas de sang, (2) Immunomodulation par la salive du moustique, favorisant l'infection des kératinocytes et des cellules de Langerhans, (3) migration des cellules infectées jusqu'au nœud lymphatique régional, (4) virémie suivie de la migration des macrophages infectés depuis les nœuds lymphatiques et (5) la rate vers les autres organes.
Source : adapté de Petersen et al.

Figure 4. Pathogenesis of WNV infection. (1) *Culex quinquefasciatus* transmitting WNV during a blood meal on susceptible host and releasing its infectious saliva, (2) immunomodulation by mosquito's saliva followed by infection of keratinocytes and Langerhans cells, (3) migration of infected cells to nearby draining lymph nodes, (4) viremia followed by migration of infected macrophage from the lymph nodes, and (5) spleen from which the virus spread to other organs of tropism. Source: Adapted from Petersen et al. [1].

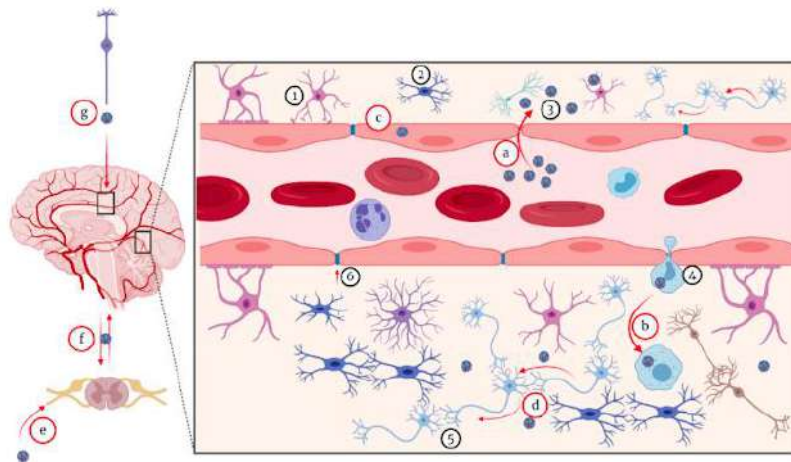


Figure 5. WNV neuroinvasive mechanisms. (a) Passive migration of free virus particles across the disrupted blood-brain barrier (BBB) through a "transudative" mechanism following increased vascular permeability, (b) "Trojan horse" mechanism through migration of infected macrophages into brain parenchyma, (c) direct infection of endothelial cell, (d) retrograde axonal transport of WNV, (e) WNV migration into spinal cord, (f) WNV migration from spinal cord to brain and vice versa, (g) neuroinvasive mechanism by transneuronal mechanism via olfactory nerve, (1) astrocyte, (2) microglia, (3) WNV particles, (4) transmigrating macrophage, (5) motor neuron, (6) blood-brain barrier (BBB) tight junction. Source: Adapted from Petersen et al. [1].

Mécanismes de neuroinvasion par le WNV. (a) Migration passive de particules virales libres par « transsudation » à travers la barrière hémato-encéphalique rendue plus perméable par l'infection, (b) Mécanisme du « Cheval de Troie » : migration de macrophages infectés dans le parenchyme encéphalique, (c) Infection directe des cellules endothéliales, (d) transport axonal rétrograde du WNV, (e) migration du WNV depuis la moelle épinière vers le cerveau et vice-versa, (f) neuroinvasion par mécanisme transneuronal via les nerfs olfactifs, (1) astrocyte, (2) microglie, (3) Particules virales de WNV, (4) macrophage infecté, (5) motoneurone, (6) jonctions serrées de la barrière hémato-méningée.
Source : adapté de Petersen et al.

Figure 11 : Schémas explicatifs de la pathogénie de l'infection par le WNV dans le cas de la forme neuroinvasive (37)

1.4. Des outils préventifs et thérapeutiques limités

Outre les conséquences économiques évidentes pour la filière équine, l'impact des infections par les orthoflavivirus sur la santé animale est dramatique. Les orthoflavivirus atteignent les chevaux de tous âges sans distinction, l'évolution clinique est brutale et peut être très grave, voire mortelle. Même en cas de guérison, les séquelles ne sont pas rares et la prise en charge de la maladie implique des frais de soin et d'hospitalisation conséquents.

En effet, pour les infections au WNV comme pour le TBEV, il n'existe pas de traitement spécifique de la maladie, la prise en charge est essentiellement symptomatique. L'équidé est sédaté et placé dans un local calme, semi-éclairé et désinsectisé. Le nursing constitue une part essentielle de la prise en charge chez ces animaux hyperesthésiques parfois incapables de se tenir debout : changement régulier de décubitus, aide à l'alimentation, litière confortable... Le traitement médical consiste en l'administration d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (comme la flunixin méglumine IV (1,1 mg/kg q12h)), et de dexaméthasone IV/IM (0,05 à 0,1 mg/kg q24h), ainsi qu'en une complémentation vitaminique (vitamines C, B1, E). Une fluidothérapie de Ringer Lactate est mise en place si le cheval présente des troubles de l'encéphale et une déshydratation, et peut être complétée avec du DMSO pour lutter contre l'œdème cérébral.

Le pronostic des encéphalites à orthoflavivirus est réservé : pour la fièvre du West Nile, on enregistre 22% de mortalité en 2004 (Zeller et al. 2004a), et jusqu'à 80% en cas de décubitus. Lors de l'épidémie de 2023 en Gironde, le Centre Hospitalier Vétérinaire de Conques a rapporté un taux de mortalité de 10 à 15%. La prise en charge efficace des signes cliniques peut donc dans les cas favorables conduire à la guérison spontanée du patient, même si des séquelles sont à déplorer dans 20% des cas : perte de poids, ataxie, faiblesse, atteinte des nerfs crâniens.

Concernant les moyens de prévention à disposition, si des vaccins existent en humaine, comme Ticovac® ou Encepur® (38) aucun vaccin n'est disponible pour protéger contre les encéphalites à tiques chez les équidés. En revanche, l'existence de vaccins contre la fièvre du West Nile utilisables uniquement chez les chevaux mais interdits chez les humains, permet une prophylaxie efficace dans les zones atteintes. Ainsi, la première campagne de vaccination de grande ampleur a été réalisée aux Etats-Unis en 2003 et a permis la stabilisation des cas équins (39). La vaccination assure une bonne protection contre l'infection et empêche la virémie ou diminue les signes cliniques en cas d'atteinte. En France, un vaccin est disponible sur le marché : Proteq West Nile® de Boehringer Ingelheim (40). Il s'agit d'un vaccin recombinant utilisant un virus canarypox exprimant les protéines E et M du WNV. Deux autres vaccins sont

disponibles dans d'autres pays européens : vaccin inactivé (Zoetis) et un vaccin recombinant utilisant le virus de fièvre jaune exprimant les protéines E et M du WNV (Intervet).. La glycoprotéine d'enveloppe E est la protéine la plus immunogène des orthoflavivirus et figure parmi les protéines les plus conservées chez les orthoflavivirus. Ainsi, il a été montré que le vaccin protège aussi bien contre les lignages 1 et 2 de West Nile. (41)

Le protocole de vaccination pour le Proteq WN®, chez les individus séronégatifs d'au moins 5 mois d'âge, consiste en deux injections de primovaccination à un mois d'intervalle, puis un rappel annuel est nécessaire (42) idéalement avant la saison de transmission permettant d'avoir un taux en anticorps neutralisants suffisant lors de la saison à risque (43). En effet, la protection vaccinale, corrélée au taux d'anticorps, s'avère plus efficace après le booster annuel, et la différence est surtout significative après le premier rappel annuel suivant la primovaccination (44).

Outre la prophylaxie vaccinale, qui n'est disponible que pour le WNV et mise en place dans les zones que l'on sait déjà atteintes, des mesures d'hygiène et environnementales sont également à mettre en place et permettent une prise en charge d'autant plus précoce : le contact avec les vecteurs doit être limité au maximum, par l'assèchement des eaux stagnantes, la désinsectisation des animaux et des locaux, l'hébergement en intérieur à l'aube et au crépuscule, où les moustiques du genre *Culex* sont les plus actifs. Une prise de température rectale régulière permet également une détection précoce d'épisode fébrile (6).

1.5. Diagnostic

1.5.1. Diagnostic clinique

Les signes cliniques observés chez les chevaux infectés par le virus du West Nile, lorsqu'ils sont présents, s'inscrivent de façon globale dans le tableau clinique des encéphalites équine, et ce peu importe la souche du virus responsable. Comme nous l'avons déjà précisé, 80% des cas d'infection passent inaperçues car elles sont asymptomatiques. Dans 20% des cas, les équidés peuvent présenter des symptômes très frustrés : après une période d'incubation de 3 à 15 jours, un état fébrile plus ou moins marqué avec une baisse de l'état général et des performances, voire de l'anorexie, de la fièvre, des coliques ou des douleurs musculosquelettiques peuvent être observés. En l'absence d'évolution vers une forme neurologique, la guérison a lieu en 20 à 30 jours (2). Dans 1 à 10% des cas présentant un syndrome fébrile, le virus atteint le tissu nerveux par la voie hématogène, et des symptômes

neurologiques se développent : des signes de myélite tout d'abord avec une ataxie ou incoordination des mouvements de grade 2 à 4 et progressive, une parésie remarquable surtout et d'abord des membres postérieurs, sur les mouvements de reculer. De l'hypermétrie peut être observée, c'est-à-dire une exagération de l'amplitude des mouvements lorsque le cheval se déplace. Des signes d'atteinte encéphalique et des nerfs crâniens sont également observables parfois, avec une paralysie faciale et une dysphagie associée, une amaurose ou encore un syndrome vestibulaire. Des tremblements musculaires, aussi appelés "tremblements encéphaliques", sont plus spécifiquement présents dans le cas d'une infection par le WNV, au niveau des muscles du tronc, de l'encolure, des épaules, de la tête... avec également des mâchonnements intermittents évocateurs. Les troubles de la vigilance apparaissent de façon plus anecdotique dans le tableau clinique. Enfin, une atteinte corticale peut mener à des troubles du comportement, tels que des chevaux qui poussent au mur, tournent en rond ou présentent une démarche ébrieuse. Dans la forme neurologique, la fièvre n'est pas systématique. Les symptômes évoluent parfois jusqu'au coma et à la mort, avec un taux de létalité pouvant atteindre 50% des cas neurologiques décrits (2).

Concernant les autres espèces d'équidés, tels que les ânes et les mules, la réceptivité au WNV et le développement d'un tableau clinique est encore peu documentée à l'heure actuelle, bien que des enquêtes de séroprévalence menées en Espagne, Bulgarie ou encore au Nigeria révèlent l'existence d'individus séropositifs sans jamais avoir déclaré de signes cliniques. De rares cas ont déjà été décrits comme en France en 2023 pour un âne ayant présentant un tableau clinique sévère (Données Laboratoire National de Référence pour le virus West Nile). Ainsi, il semblerait que les mules et les ânes soient plus résistants au développement de formes cliniques, même si l'infection et le développement de signes cliniques apparaissent donc possible.

Pour ce qui est de l'encéphalite à tiques due au TBEV, aucun cas clinique n'a encore été recensé en France, cependant le TBEV est bien à l'origine de symptômes neurologiques chez les équidés, avec des cas rapportés dans les pays européens voisins : Autriche, Allemagne, Lituanie, Suisse... D'après ces rapports, qui demeurent encore rares, les signes cliniques sont globalement similaires et peu spécifiques, avec cependant une prédominance de signes d'atteinte encéphalique suivant une phase fébrile plus ou moins marquée (25) : marche compulsive, amaurose, poussée au mur. On retrouve également une atteinte des nerfs crâniens, une sensibilité cutanée exacerbée et des trémulations musculaires, une hyperesthésie, de l'ataxie et de l'hypermétrie, une paralysie des muscles du cou et des épaules, voire des convulsions (24, 25).

A titre de rappel, le virus Usutu n'est pas à l'origine de signes cliniques chez les équidés. Il est responsable de signes cliniques chez certaines espèces d'oiseaux tels que les merles noirs et chouettes laponnes. Ces deux espèces sont très sensibles et présentent un fort taux de mortalité à la suite d'une infection USUV. Les signes développés sont : plumage ébouriffé, anorexie, tremblement, port de tête anormal, incapacité de voler,... (45).

Comme on peut le voir, le tableau clinique regroupe un grand nombre de symptômes neurologiques peu spécifiques, et tout trouble nerveux peut et doit faire penser à une infection par le West Nile Virus, voire par le TBEV selon le contexte épidémiologique.

1.5.2. Diagnostic différentiel

Le WNV et le TBEV ne sont pas les seuls agents pouvant être à l'origine de signes neurologiques chez les équidés, il convient donc de prendre en compte la situation dans sa globalité et l'ensemble des hypothèses diagnostiques. Ainsi, une catégorisation des signes neurologiques observés permet déjà de préciser la zone du tissu nerveux atteinte : une ataxie comme unique symptôme signe plutôt une atteinte médullaire seule, qui peut être causée par un traumatisme, une myélopathie cervicale compressive (syndrome de Wobbler), ou encore une infection par le virus de l'herpès équin de type 1 (EHV1). Quant aux signes d'encéphalites, qui sont des troubles du comportement, de la conscience, de la proprioception ou encore des signes d'atteinte des nerfs crâniens, la liste des causes possibles est extrêmement vaste, et présenté dans le *Tableau 1* ci-dessous : (46)

Tableau 1 : Etiologie des affections neurologiques chez les équidés

Catégorie	Affection	Symptômes et caractéristiques spécifiques (outre les signes neurologiques communs aux encéphalites)
Encéphalites virales <i>(première cause d'encéphalite équine)</i>	Herpèsvirose équine de type 1 (EHV1)	<ul style="list-style-type: none"> • Epizooties (contagiosité élevée) • Sujets âgés, gestation, densité élevée, hygiène médiocre • Période d'incubation de 48h • Parésie postérieure • Démarche hésitante, pédalage, atonie vésicale et de la queue, œdèmes sous-cutanés
	Fièvre ou maladie de West Nile (WNV)	<ul style="list-style-type: none"> • Caractère saisonnier : cas clinique entre juillet et novembre en France • Première phase fébrile (passant souvent inaperçue) • Prédominance des syndromes myélitiques et encéphalitiques → ataxie, tremblements de la tête et du tronc assez pathognomoniques
	Maladie de Borna	<ul style="list-style-type: none"> • Absente en France à ce jour (Allemagne, Etats-Unis, Japon...) • Infection saisonnière : printemps et début de l'été • Période d'incubation de deux semaines à plusieurs mois • Contamination directe par les sécrétions nasales
	Rage	<ul style="list-style-type: none"> • Absente en France à ce jour • Réservoir : chiroptères • Inquiétude, agressivité

	Encéphalite à tiques (TBEV)	<ul style="list-style-type: none"> • Non décrite en France à ce jour • Prédominance des signes encéphalitiques : troubles du comportement
Encéphalites bactériennes	Encéphalites bactériennes non spécifiques	<ul style="list-style-type: none"> • Poulains : septicémie • Adultes : infection des voies respiratoires supérieures, traumatisme...
	Lyme	<ul style="list-style-type: none"> • Présence en France • Arthrite, œdème des membres • Diagnostic ante-mortem difficile
Encéphalites parasitaires	Larves d'helminthes ou de mouches	<ul style="list-style-type: none"> • Modification du liquide céphalorachidien • Atteinte cérébrale ou spinale d'évolution aigue
	Méningoencéphalite à protozoaires : <i>Neospora</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Absente en France : chevaux importés des Etats-Unis • Ataxie, troubles des nerfs crâniens, asymétrie
Encéphalites toxiques	Botulisme	<ul style="list-style-type: none"> • Apyrétique • Période d'incubation d'1 ou 2 jours • Paralyse flasque (absence de tonus lingual) • Conscience et sensibilité non altérées
	Tétanos	<ul style="list-style-type: none"> • Paralyse spastique : tétanie localisée ou généralisée (raideur, procidence de la membrane nictitante)

	Toxiques chimiques (mercure, organophosphorés, métaldéhyde, monensin)	<ul style="list-style-type: none"> Contexte et risque d'exposition
	Végétaux (Solanacés, ombellifères, acacia)	<ul style="list-style-type: none"> Contexte et risque d'exposition
Encéphalites fongiques	Fusarium	<ul style="list-style-type: none"> Alimentation par des fourrages ensemencés
Malformations congénitales		<ul style="list-style-type: none"> Sujets plutôt jeunes
Origine traumatique		<ul style="list-style-type: none"> Contexte
Origine métabolique	Hypoglycémie, hypoxie, trouble de la natrémie, encéphalose hépatique, hyperammoniémie d'origine digestive	<ul style="list-style-type: none"> Analyses sanguines anormales
Origine dégénérative	Dystrophie neuroaxonale ou myéloencéphalopathie dégénérative	<ul style="list-style-type: none"> Non différentiable cliniquement d'une myélopathie compressive (syndrome de Wobbler) Forme juvénile ou retardée
Encéphalite idiopathique	Epilepsie, narcolepsie	/
Origine vasculaire	Thromboembolie	/

Un examen clinique rigoureux et complet associé à une démarche diagnostique hiérarchisée sont donc essentiels pour réaliser le diagnostic clinique de la maladie de West Nile. Une synthèse de la démarche diagnostique clinique est proposée dans la thèse de M. Hesse, basé sur des points essentiels : (46)

Recueil de l'anamnèse et commémoratifs :

- Âge : les poulains sont davantage sujets aux encéphalites bactériennes, tandis que l'on retrouve plus fréquemment une forme nerveuse de la rhino pneumonie chez les animaux âgés.
- Zone géographique : il est intéressant de connaître les caractéristiques de la région (climat, humidité) ainsi que la prévalence des espèces vectrices propres aux différentes maladies (tiques, moustiques...) pour orienter les hypothèses diagnostiques.
- Saisonnalité : la distribution temporelle des maladies vectorielles dépend du cycle biologique des vecteurs
- Mode de vie : en effet, l'exposition aux vecteurs est différente selon l'habitat des chevaux, s'ils vivent au pré ou au box...
- Statut vaccinal et parasitaire

Examen clinique général et plus spécifique, consistant en un examen neurologique approfondi d'avant en arrière :

- Examen à distance : modification du comportement, posture
- Examen rapproché : réponses aux *stimuli*, état de vigilance
- Examen dynamique : démarche et coordination
- Tests neurologiques des nerfs crâniens
- Examen du tronc, encolure, membres et queue : recherche d'amyotrophie ou d'une asymétrie de la musculature, sensibilité cutanée, réactions posturales

Malgré ces connaissances, des subtilités de chaque virus, pour tous ces virus, les symptômes sont donc assez similaires et la clinique ne permet pas un diagnostic discriminant de façon certaine les différentes espèces virales. Les techniques de diagnostic biologique (identification du matériel génétique viral par (RT-)PCR) et des tests immunologiques basés sur les caractéristiques communes des orthoflavivirus (hémagglutination, test de

séroneutralisation, ELISA...) sont alors nécessaires pour identifier l'étiologie exacte responsable des signes cliniques observés.

1.5.3. Diagnostic biologique

Les examens biologiques, non spécifiques, ne sont pas d'un grand intérêt dans la conduite diagnostique d'une encéphalite virale. En effet, des marqueurs généraux d'inflammation et d'infection sont observables sur les analyses hématologiques, tels qu'une leucocytose ou leucopénie, ou une augmentation de la concentration en fibrinogène. Les examens hématologiques et biochimiques permettent tout au plus d'exclure d'autres causes métaboliques de troubles nerveux observés, comme une encéphalose hépatique. De même, l'analyse du liquide céphalo-rachidien (LCR) ne permet pas de conforter le diagnostic d'une infection au WNV : elle permet à la rigueur une évaluation de la perméabilité de la barrière hémato-méningée par comparaison de l'albuminémie sanguine et de l'albuminémie dans le LCR. A titre d'information, l'analyse du LCR a davantage d'intérêt lors d'une suspicion d'infection à un herpès virus, où on observe une élévation disproportionnée de la concentration en protéines dans le LCR par rapport au nombre de cellules observées. De même, le type cellulaire dominant dans le LCR permet d'orienter le diagnostic dans le cas d'une infection bactérienne, parasitaire ou d'une encéphalite à protozoaires, de l'Ouest ou de l'Est (47).

Les méthodes de diagnostic biologique spécifiques les plus pertinentes dans le cas d'une maladie donnée dépendent de la pathogénie de l'agent et du profil de la réaction immunitaire développée par l'hôte. Dans le cas d'une infection par le WNV mais également par les autres orthoflavivirus d'intérêt de cette étude, la virémie est faible et de courte durée. Il semblerait néanmoins que le virus soit détectable plus longtemps dans les urines que dans le plasma, le sérum ou le liquide cébrospinal dû à un potentiel portage rénal. De même, le WNV est capable d'adhérer aux hématies, cela expliquant que la maladie soit transmissible par transfusion sanguine de sang total. Une réaction immunitaire humorale se met en place ensuite : les IgM sont détectables dès 4 jours post-infection, et jusqu'à deux mois plus tard. Les IgG sont détectables dès 8 jours après l'infection, et sont encore présents plusieurs années après (*Figure 12*) (9).

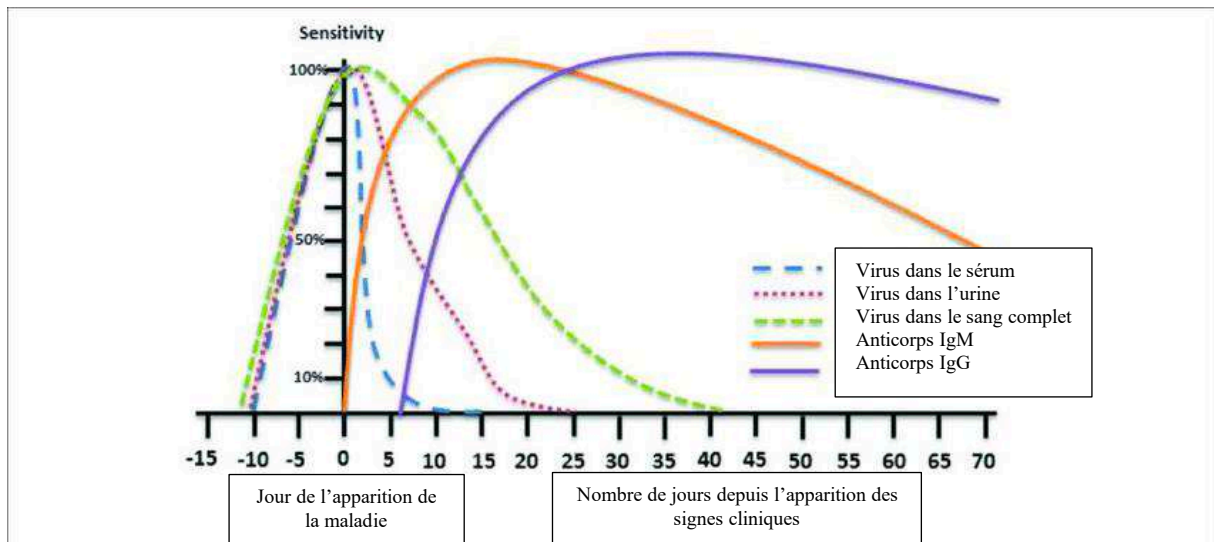


Figure 12 : Graphique de l'évolution dans le temps de la présence du virus ou des marqueurs d'infection virale dans les différents fluides de l'organisme infecté par le WNV (9)

Les caractéristiques de l'infection aux orthoflavivirus impliquent ainsi qu'aujourd'hui, le diagnostic biologique de la fièvre du West Nile consiste principalement en un diagnostic sérologique, c'est-à-dire en une recherche dans le sérum des anticorps de type IgM spécifiques au virus, voire en une mise en évidence de la séroconversion des IgG par deux titrages sérologiques espacés de 10 à 15 jours (4). Cependant, il est important de considérer les inconvénients de ces méthodes de dépistage basées sur la détection d'anticorps spécifiques de l'infection : des résultats faussement négatifs peuvent être dus au profil temporel de la réaction immunitaire et notamment à la latence de la séroconversion, d'où l'importance du paragraphe précédent. Des faux positifs sont également possibles, chez les individus vaccinés, de même que chez les très jeunes qui sont encore sous la protection des anticorps d'origine maternelle. D'autre part, l'affinité des anticorps utilisés pour la révélation des IgG spécifiques n'est pas toujours totale, et des réactions croisées peuvent également conduire à un diagnostic faussement positif. En effet, la fiabilité d'un test est liée aux caractéristiques de l'interaction Ag/Ac (Figure 13) :

- La spécificité diagnostique (=nombre de négatifs trouvés/(nombre de vrais positifs + nombre de faux négatifs)) dépend de la capacité de l'Ac à reconnaître un seul déterminant antigénique (épitope)
- La sensibilité diagnostique (= nombre de positifs trouvés/(nombre de vrais positifs + nombre de faux négatifs)) dépend de la capacité d'un sérum/anticorps à détecter de faibles quantités d'antigènes

- L'affinité est fonction de la force de l'interaction épitope/paratope
- L'avidité désigne la stabilité du complexe Ag/Ac
- On parle de réaction croisée quand deux antigènes différents partagent un même épitope, ou lorsque deux épitopes apparentés reconnus par le même anticorps.

Un antigène peut présenter un seul ou plusieurs épitopes reconnus par différents anticorps : reconnaissance monoclonale (anticorps monospécifiques en grande quantité) ou polyclonale (anticorps polyclonaux, haute affinité, sérum hétérogène).

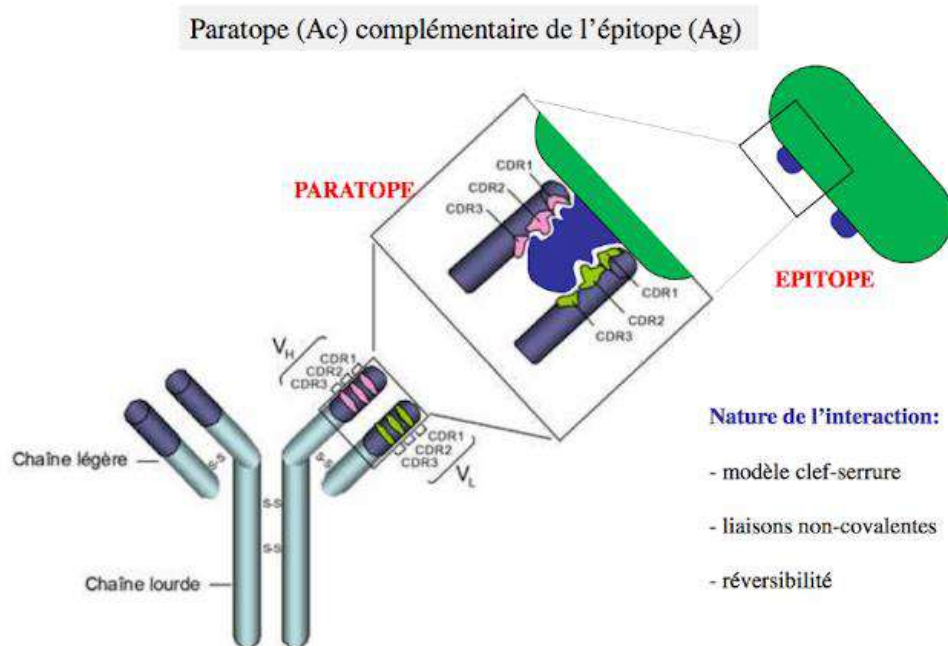


Figure 13: Schéma de rappel sur les interactions Ac/Ag lors de la réponse immunitaire (48)

Ainsi, des souches virales différentes présentant des antigènes très proches peuvent être reconnues par un même anticorps, en fonction de la spécificité de celui-ci et du type de reconnaissance Ac/Ag. C'est le cas pour le genre des orthoflavivirus, qui partagent des antigènes communs (notamment le domaine DII de la protéine E) à l'origine de la synthèse d'anticorps ainsi capables de réagir avec plusieurs virus. Au sein de ce genre plusieurs sérocomplexes sont décrits, notamment celui de l'encéphalite japonaise dans lequel WNV et USUV appartiennent. De ce fait, le diagnostic sérologique n'est pas spécifique d'un virus, mais d'un groupe antigénique correspondant à de nombreux virus (9, 49). En raison de ce manque de spécificité des tests sérologiques, le diagnostic sérologique chez les équidés nécessite la combinaison d'au moins deux tests.

Outre ce diagnostic biologique indirect par détection des anticorps marqueurs de l'infection, et malgré une phase virémique initiale limitée, il est tout de même possible de diagnostiquer une infection au WNV par isolement et identification du virus dans les trois premiers jours de la maladie : c'est une mise en évidence directe qui ne dépend pas de la cinétique de la réaction immunitaire et des possibles biais associés au diagnostic indirect. La principale limite de cette technique, outre la nécessaire précocité de la suspicion clinique, est de prélever un fluide contenant suffisamment de matériel viral pour permettre sa détection. Pour le virus du West Nile, l'isolement est possible sur un prélèvement *post-mortem* à partir de tissu cérébral. L'expédition du prélèvement sanguin se fait ensuite sous couvert de froid vers le Laboratoire National de Référence pour le virus West Nile. La présence de virus est d'abord testée par **RT-PCR (Reverse-transcription - polymerase chain reaction)** (4), dont le principe est une amplification *in vitro* encadrée par des amorces d'un segment d'ADN à partir d'un génome complet ou d'un mélange de séquences après une étape de transcription inverse (passage de l'ARN vers ADN sous l'action d'une reverse transcriptase après extraction des ARN totaux) (Figure 14). Pour éviter la réactivité croisée et garantir la fiabilité du résultat, la séquence cible choisie doit être spécifique du virus recherché. Pour cela, des alignements de séquences virales issues de différents orthoflavivirus permettent de mettre en évidence des zones conservées entre espèces virales (37). Ces zones conservées sont ciblées et utilisées pour le design des amorces. Au LNR West Nile, la cible utilisée est la protéine de la capside pour la détection du WNV par RT-PCR (50).

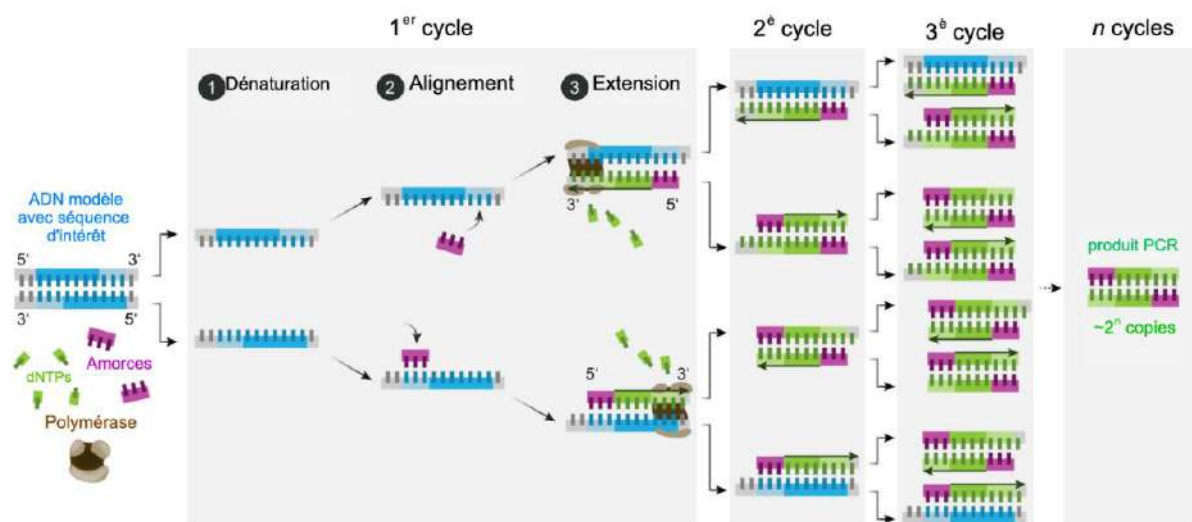


Figure 14 : Principe de la technique d'amplification par PCR (Polymerase chain reaction) (51)

Pour la RT-PCR, une étape de transcription de l'ARN viral en ADN par l'enzyme transcriptase inverse précède les étapes de ce schéma.

1.5.4. Diagnostic histologique

L'étude des lésions tissulaires, et de leur localisation, permet dans une certaine mesure de dégager un tableau lésionnel assez caractéristique de différentes encéphalomyélites équine. Dans le cas d'une encéphalite à West Nile, la topographie des lésions s'inverse par rapport aux autres encéphalites puisque les lésions les plus intenses sont observées dans la partie postérieure du cerveau et de la moelle épinière. Les lésions en question se définissent par une poliomyélite avec atteinte des cornes ventrales, motrices de la moelle épinière. En revanche, le cerveau présente des lésions plus discrètes, caractérisées par de l'œdème en région méningée et sous-méningée, ou une péri vascularite lymphocytaire (4).

1.5.5. Dépistage

Dans le cadre de notre étude, on s'intéresse davantage aux différentes méthodes de dépistage des maladies causées par les orthoflavivirus, plutôt que de diagnostic. Autrement dit, dans un objectif d'étude de la séroprévalence d'un agent pathogène dans une région et une population donnée, on recherche les traces d'une infection présente ou passée chez des individus asymptomatiques. D'après la cinétique de la production des immunoglobulines présentée précédemment, on recherchera donc dans ce cas plutôt la présence des IgG. Il est nécessaire cependant de prendre en considération le statut vaccinal de l'animal testé : en effet, la vaccination interfère avec le diagnostic sérologique.

- *La technique ELISA*

La technique de mise en évidence des anticorps la plus utilisée à ce jour pour le dépistage d'une infection aiguë ou antérieure au West Nile chez les équidés, utilisée par le LNR West Nile et les laboratoires agréés pour le diagnostic sérologique, est la **technique ELISA, ou Enzyme linked immunosorbent assay**. C'est en effet une technique très sensible (ng), qualitative ou quantitative, et automatisable. La technique ELISA peut être utilisée pour détecter la présence d'anticorps dans un sérum à tester, ou d'antigènes d'un agent pathogène. Le principe reste le même : on utilise un anticorps conjugué de l'anticorps ou de l'antigène recherché, et lié à une enzyme catalysant la transformation d'un substrat chromogène en un produit de couleur différente. La lecture du résultat se fait alors au spectrophotomètre en fonction de l'intensité de la coloration (9, 6).

Pour confirmer une primo-infection à WNV chez un équidé, la détection des IgM et IgG permette de poser le diagnostic. En cas d'un résultat douteux pour un des deux tests, un second prélèvement est nécessaire. De plus d'autres tests sont réalisés en parallèle, comme la séroneutralisation qui est détaillée plus bas. Dans un contexte de dépistage comme dans notre étude, c'est la recherche d'anticorps spécifiques des orthoflavivirus évoqués, plus précisément de type IgG qui présente un intérêt. Pour se faire, il existe différents types de tests ELISA :

- **ELISA indirect** : ce test permet de révéler seulement les IgG sériques. Ceux-ci reconnaissent l'antigène viral fixé sur la plaque du test, et sont révélés avec un anticorps anti-espèce lié à une enzyme (Figure 15). Cela implique qu'un test ELISA indirect soit spécifique d'une espèce donnée. Étant donnée la grande variété d'hôtes potentiels au WNV et aux autres orthoflavivirus, l'ELISA indirect est aujourd'hui de moins en moins utilisé dans la détection de ceux-ci, au profit de l'ELISA de compétition.
- **ELISA de compétition** : cette technique cible tous les isotypes d'anticorps, et permet à priori de tester toutes les espèces concernées avec un même conjugué. En effet, l'anticorps conjugué fourni avec le test cible l'antigène propre au virus coaté sur la plaque du test, au même titre que les anticorps sériques que l'on cherche à mettre en évidence. L'anticorps conjugué monoclonal spécifique de l'antigène viral entre ainsi en compétition avec les anticorps sériques pour la fixation au site antigénique. (Figure 15) C'est la technique la plus sensible de tous les tests ELISA présentés ici. Cependant, elle est moins spécifique que la technique MAC ELISA.
- **MAC ELISA (IgM Antibody-Capture ELISA)** : cette technique met en évidence les IgM dirigés contre un agent pathogène donné, et permet ainsi la détection d'une infection aiguë ou récente (Figure 13). Ici, ce sont les IgM sériques qui sont capturés sur la plaque recouverte d'anticorps anti-IgM spécifiques à une espèce. Ces IgM capturés vont eux-mêmes se lier à l'antigène viral ensuite ajouté, et retenir indirectement l'anticorps conjugué spécifique de cet antigène (Figure 15). Cette technique présente moins de risque de réaction croisée que les deux autres techniques.

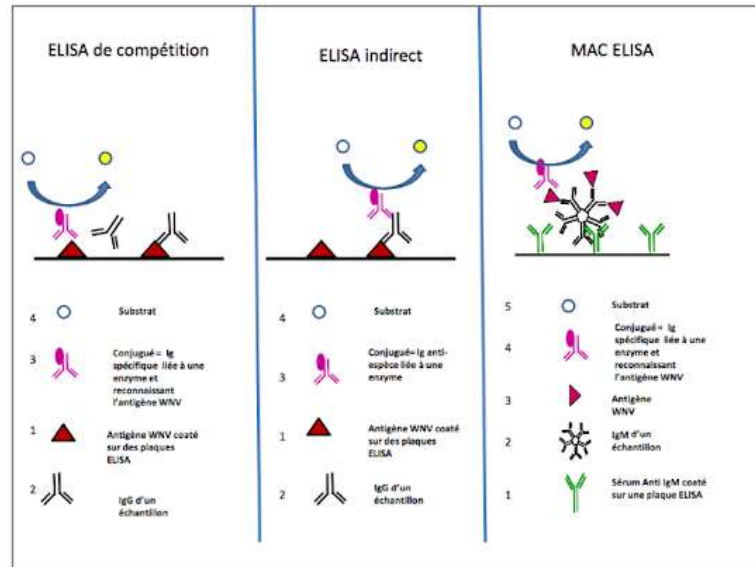


Figure 15 : Principe de trois méthodes d'ELISA pour la recherche d'anticorps sériques (64)

Ainsi, si le dépistage par les techniques ELISA de routine (de compétition ou indirect) est très sensible et permet la mise en évidence d'une infection passée ou présente par un orthoflavivirus, il n'est à ce jour pas assez spécifique pour discriminer les différentes souches virales et aboutir à une identification complète lorsque seuls les anticorps de type IgG sont détectés par test ELISA. La mise en place de d'autres tests plus spécifiques est nécessaire.

- *Le test de séroneutralisation*

Pour cela, on utilise un deuxième test sérologique sur les échantillons trouvés positifs avec le test ELISA pour la détection des anticorps de type IgG : le **test de séroneutralisation (SNT)**. (4, 52) Cette méthode permet la détection et la quantification d'anticorps neutralisants spécifiques pour un virus dans un échantillon de sérum : les anticorps spécifiques contenus dans un sérum à tester neutralisent le virus et empêche ce dernier d'infecter des cellules. L'observation au microscope de la présence d'effet cytopathique (ECP) permet l'évaluation de la présence d'anticorps. En effet, un tapis cellulaire présentant des ECP signifie qu'il n'y avait pas d'anticorps présents dans le sérum. A l'inverse, l'absence d'ECP coïncide avec la présence d'anticorps neutralisants. Les sérums étant dilués en cascade, la quantification des anticorps est possible et est inversement proportionnelle à la dilution du sérum. Le déroulement de la technique est le suivant :

- 1) Dilution en série du sérum et ajout d'une dose viral égale à 100 TCID₅₀
- 2) Incubation pendant 1h30 à 37°C, 5% CO₂

3) Ajout des cellules cibles sensibles à l'infection virale Les cellules utilisées pour les SNT sont généralement des cellules VERO (cellule épithéliale de reins du singe vert d'Afrique).

3) Quantification par observation ou non de l'effet cytopathogène ou par technique immuno-réactive après 3 jours d'incubation pour WNV, 4 jours pour USUV et 5 jours pour TBEV.

Cette technique est plus spécifique que le test ELISA pour la détection des anticorps IgG. Elle permet l'obtention d'un résultat quantitatif, utile en cas de réactivité croisée comme c'est le cas pour les orthoflavivirus recherché chez les équidés. Cependant, il s'agit d'une technique qui est chronophage et nécessite la manipulation des virus dans un laboratoire de biosécurité de niveau 3.

D'autres tests sérologiques existent pour le dépistage de la fièvre du West Nile d'après la littérature (4), mais sont en réalité de moins en moins utilisés aujourd'hui car caduques et peu sensibles. On pourra citer la technique d'inhibition de l'hémagglutination, ou la technique de fixation du complément.

Pour résumer, plusieurs techniques sont envisageables pour la détection d'une affection virale. Le choix de la technique la plus adaptée dépend des caractéristiques et objectifs de l'étude et de la maladie. Dans notre cas, l'enjeu est le dépistage d'une circulation virale, et non le diagnostic d'une affection dans un contexte de suspicion clinique : on se tourne donc vers un protocole d'une très bonne sensibilité (on veut minimiser la quantité de faux négatifs). Cette caractéristique va de pair avec un seuil de positivité le plus faible possible : d'après les données présentées dans la *Figure 16*, les test ELISA et de séroneutralisation virale sont parmi ceux qui offrent des limites inférieures de détection les plus basses. D'ailleurs, la technique de séroneutralisation virale est considérée comme le gold standard en virologie : un résultat négatif peut être considéré comme indubitable. (48) D'autre part, nous sommes ici dans le cadre d'une étude à grande échelle avec plusieurs centaines d'échantillons testés, les facteurs économiques, de reproductibilité et de facilité de mise en œuvre sont donc également essentiels à prendre en compte. C'est pourquoi, il est justifié de ne pas se tourner vers la technique de dosage radio-immunologique, certes très sensible mais qui entraîne des risques d'exposition aux radiations et des problèmes de gestion des déchets radioactifs.

**Limites inférieures de détection des épreuves sérologiques usuelles
(plus petite concentration détectable)**

Tests	µg/mL (protéines)
Réactions primaires	
Radio-immuno essai compétitif	0,00005
ELISA	0,0005
Réactions secondaires	
Neutralisation virale	0,00005
Inhibition de l'hémagglutination	0,005
Neutralisation des toxines	0,005
Fixation du complément	0,05
Agglutination directe	0,01 à 1
Test de l'anneau	2 à 15
Précipitation en gélose	0,5 à 30
Réactions tertiaires	
Anaphylaxie cutanée induite/IDR	0,08 à 32

Figure 16 : Comparaison des seuils de détection des différentes techniques de détection sérologique usuelles (48)

2. Enquête 2023 sur le portage des arbovirus par les équidés en Gironde

2.1. Enjeux et objectifs de l'enquête

2.1.1. Des enjeux multiples en santé humaine et animale

2.1.1.1. *Une maladie réglementée à potentiel zoonotique*

La fièvre du West Nile est responsable de symptômes neurologiques graves chez l'humain. C'est pourquoi elle est classée en catégorie E par la loi européenne de santé animale datant de 2021, avec obligation de déclaration et de surveillance. Plus précisément, la déclaration de cas à la Commission Européenne est obligatoire pour l'avifaune depuis 2021, mais les cas équins et humains sont concernés par cette réglementation depuis 2009 (53). Ainsi, en cas de suspicion d'une infection par le virus du West Nile, des prélèvements sont réalisés par le vétérinaire sanitaire à visée diagnostique, et si la suspicion s'avère vérifiée, le cas sera immédiatement déclaré.

2.1.1.2. Les équidés, marqueurs sentinelles de la circulation des orthoflavivirus et enjeu One Health

Le contrôle et le suivi de la circulation des orthoflavivirus est un enjeu actuel d'importance majeure, d'autant que la plupart des infections sont asymptomatiques, rendant la surveillance passive, telle qu'elle est faite en France, difficile, et donc la détection tardive. Pourtant, leur présence à bas bruit dans un territoire sans mesure préventive associée représente un danger important pour la santé publique : en effet, la protection contre les arthropodes vecteurs ne suffit pas, car il existe des moyens de transmission non vectorisés du virus : les secteurs hospitaliers doivent également prendre des précautions en termes de transfusions

sanguines, dons d'organes qui sont une source potentielle de contamination. Une infection lors d'activités professionnelles est également possible par voie conjonctivale, percutanée lors de manipulations de tissus infectés ou de matières fécales d'animaux infectés voire même peut-être par aérosols. Cela concerne donc notamment les vétérinaires lors d'autopsies, les techniciens de laboratoire ou les éleveurs avicoles (2).

Des programmes de surveillance épidémiologique basés sur plusieurs facteurs aident ainsi les autorités compétentes à prendre les mesures nécessaires pour protéger la santé humaine et animale. Ces programmes sont fondés sur la surveillance des oiseaux sauvages, notamment de certaines espèces sentinelles comme les corvidés, et des populations humaines et équinnes. Dans beaucoup de pays européens, les équidés constituent l'espèce animale sentinelle de choix dans le système One Health, et sont ainsi utilisés dans plusieurs études de surveillance épidémiologique récentes en France, Allemagne ou Belgique : une étude de séroprévalence du WNV et des orthoflavivirus associés que sont le TBEV et l'USUV menée en Allemagne en 2023, précise que cette surveillance chez les chevaux non vaccinés constituerait le marqueur d'alerte le plus précoce d'un risque d'infection humaine. De même, pour le TBEV, le dépistage sérologique des équidés représente un outil efficace d'estimation de la prévalence du virus sur un territoire, ajouté à la détection du TBEV chez les tiques et au signalement des cas humains (49).

En effet, leur mode de vie à la fois proche de l'Homme et en extérieur en fait de bons marqueurs d'exposition aux vecteurs d'orthoflavivirus. On pourra par ailleurs noter que ces caractéristiques, partagées avec les chiens de bergers ou d'élevage, en font également de bons marqueurs sentinelles de la circulation du WNV et de l'USUV dans un écosystème, d'après une étude menée en France en 2023 (28). De plus, contrairement aux oiseaux sauvages ou aux arthropodes, les chevaux sont faciles à approcher et à prélever. En outre, les équidés sont particulièrement sensibles à l'infection par le WNV, le TBEV ou l'USUV, et développent une réponse immunitaire facilement identifiable par analyse sérologique, avec la production massive de deux types d'immunoglobulines : les IgM et IgG, ces dernières étant détectables au moins 15 mois post-infection (Ostlund et al. 2001) voire à vie d'après certains auteurs (2). Pour WNV comme TBEV, un autre avantage d'utiliser les chevaux comme sentinelles est la possibilité de mettre en évidence des *microfoci* d'infection et d'obtenir une cartographie précise de la séroprévalence, à une moindre échelle (49). D'autre part, dans les régions où beaucoup de chevaux sont vaccinés contre le virus du West Nile, il peut être intéressant de considérer les autres espèces d'équidés (ânes, mules) comme espèces sentinelles tout aussi efficaces (54).

Dans le contexte actuel, les arboviroses comme celles causées par les orthoflavivirus émergent dans des territoires toujours plus étendus. Au vu de leurs conséquences pour la santé humaine et animale, et des moyens de lutte très limités à existants, il est essentiel d'anticiper ces mouvements et d'améliorer les moyens de détection précoces d'émergence pour en gérer l'impact.

2.1.2. Objectif de l'enquête : une première documentation sur la circulation des orthoflavivirus dans le département de Gironde

Dans le contexte d'émergence du virus du West Nile dans le Sud-Ouest de la France hexagonale, une première enquête épidémiologique a été menée au cours de l'année 2023 dans le département de Gironde afin d'évaluer l'intensité de la circulation du WNV sur ce territoire nouvellement atteint en 2022, et de dégager les facteurs de risques d'infection. L'objectif était également de fournir une première base de données concernant la prévalence des orthoflavivirus chez les équidés dans cette région.

2.2. Matériel et méthodes

2.2.1. Conception de l'étude

Suite à la confirmation de trois cas autochtones d'infection par le virus du West Nile dans la population équine de Gironde en octobre 2022, la première enquête de séroprévalence de la région a été initiée parmi les équidés vivant dans les structures proches des cas déclarés, dans l'objectif d'apporter des données concrètes sur la circulation du WNV, mais aussi USUV et TBEV dans ce territoire nouvellement touché.

De nombreux acteurs ont travaillé ensemble au cours de cette étude, à savoir : la Clinique Équine de Conques, le RESPE (Réseau d'épidémiosurveillance en pathologie équine), l'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail), la DDPP 33 (Direction départementale de la protection des populations de Gironde), et les vétérinaires traitants de Gironde.

L'enquête de séroprévalence a été menée du 15 avril au 31 mai 2023, afin de refléter au mieux l'exposition des équidés aux virus au cours de l'été problématique 2022. Cette période d'échantillonnage s'est voulue achevée avant le début de la saison d'activité estivale des moustiques en 2023, pour ne prendre en compte que les chevaux infectés au cours de la saison estivale de 2022. En effet, d'après les connaissances actuelles sur les caractéristiques des vecteurs principaux du WNV en France hexagonale, le moustique *Culex pipiens pipiens*, la

femelle de cette espèce de moustique est capable de survivre toute l'année grâce à la stratégie de diapause hivernale, se réfugiant dans les caves, les salles de chaudière... (55). Cependant, l'activité piqueuse mais aussi la compétence vectorielle de ces moustiques, c'est-à-dire leur capacité à transmettre le virus à l'hôte piqué, dépend de la température extérieure. Ainsi, en Europe, la transmission du WNV par le moustique *Culex* lors d'un repas sanguin serait significativement plus élevée pour une température extérieure supérieure à 18°C (56). D'ailleurs, on observe de façon empirique en France, et plus précisément en Gironde, une augmentation de la nuisance causée par les moustiques surtout durant les mois de juillet et d'août. D'autre part, les cas cliniques humains et équinés déclarés présentent tous des symptômes en été ou à l'automne, correspondant à une infection au plus tôt en fin de printemps, si l'on se base sur la période d'incubation du WNV qui est de 5 à 15 jours.

Le recrutement des équidés échantillonnés a été réalisé au sein de la clientèle du Centre Hospitalier Vétérinaire Equin de Conques (Saint Aubin de Branne, Gironde) par courrier électronique pour les structures localisées dans la zone d'étude, et également à travers les réseaux sociaux, à l'aide d'un flyer informatif expliquant le principe de l'étude (*Annexe 2*). Cette étude a été approuvée par le Comité d'éthique pour la recherche clinique (ComERC) de l'École vétérinaire d'Alfort (EnVA) (numéro d'accord : 2023-06-23). Les prélèvements ont été anonymes et gratuits pour les détenteurs de chevaux, et un consentement éclairé a été signé avant toute collecte de données ou d'échantillon sanguin (*Annexe 3*). Ils ont été réalisés par le Dr Noémie Chevalier (résidente en médecine interne à la Clinique Equine de Conques), assistée par Clément Bigeard, vétérinaire et ISPV stagiaire alors en stage à la DDPP 33 et au LNR West Nile et instigateur du projet. Dr Marianne Depecker (vétérinaire associée à la Clinique Equine de Conques) et moi-même, alors étudiante en 3ème année à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, ainsi que les vétérinaires exerçant dans la région, avons également participé à la collecte des échantillons sanguins et des données épidémiologiques. De plus, un recueil de données par cheval a été effectué dans le but de déterminer des facteurs de risque d'infection, cela est détaillé plus loin.

2.2.2. Découpage de l'aire géographique de l'étude

L'étude a été menée dans le département de Gironde, dans le Sud-Ouest de la France, un département situé sur le littoral océanique, au paysage contrasté, abritant vallées, terres de polyculture, forêts et vignes (*Figure 17*). Néanmoins, 75% de la population humaine y est citadine, notamment avec la présence de son chef-lieu, la métropole de Bordeaux. Ce

département de la région Nouvelle-Aquitaine doit son nom à l'estuaire de la Gironde, le plus large d'Europe, où se rejoignent les fleuves de la Garonne et de la Dordogne. Entre ces deux fleuves se trouve le plateau calcaire de l'Entre-Deux-Mers (57, 58). Le littoral est marqué par son occupation urbaine intense et saisonnière, notamment autour du bassin d'Arcachon. L'estuaire quant à lui, présente des dynamiques géographiques spécifiques : fortement soumis aux marées, l'accumulation d'alluvions en fait une terre viticole humide, riche et marécageuse. Le climat girondin est tempéré, de type océanique : les hivers y sont relativement doux et les étés chauds. C'est un département ensoleillé et humide, avec des précipitations bien réparties sur les saisons.

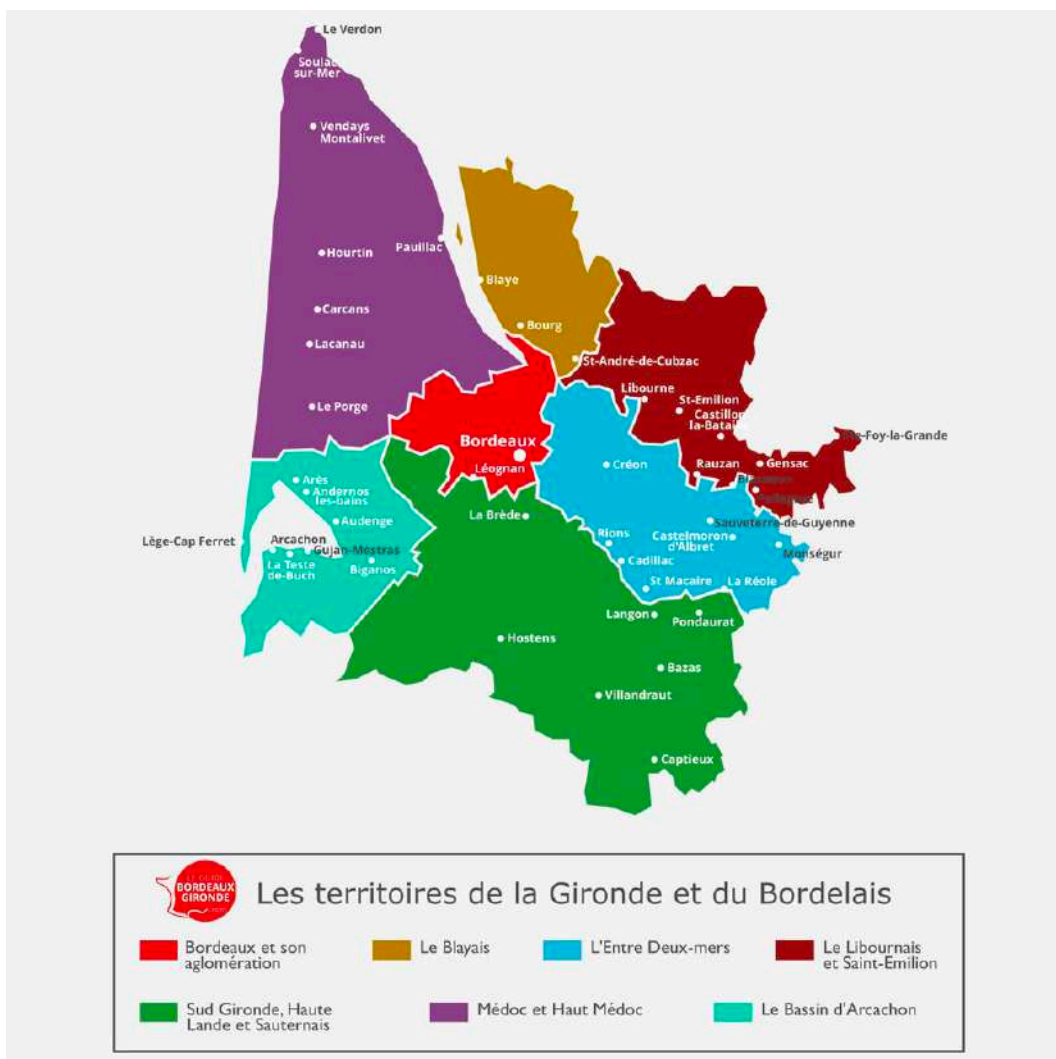


Figure 17 : Les territoires de la Gironde (59)

Les chevaux et les sports équestres ont une place importante dans la région. La métropole bordelaise abrite ainsi le pôle équestre du Bouscat, qui accueille notamment chaque

année le célèbre Jumping de Bordeaux. Les courses hippiques, l'élevage, les centres d'entraînement et surtout les structures équestres font aussi la dynamique de la filière équine en Gironde. En tout, la Gironde génère 20% du chiffre d'affaire régional de la filière équine en Nouvelle-Aquitaine, et abrite près de 17 000 équidés, en grande majorité des chevaux de selle (60, 61).

Le département de Gironde est également une réserve de biodiversité précieuse et protégée. Une partie importante du territoire est classée comme réserve naturelle, favorisant la préservation des espèces animales et végétales et la protection des écosystèmes (Figure 18).



Figure 18 : Les aires protégées du département de Gironde (62)

(Légende : les repères circulaires rouges représentent les réserves naturelles nationales, et les étoiles orange indiquent les réserves nationales régionales. Le cercle rouge montre le département de Gironde)

Des actions sont en particulier menées en faveur de la protection des espèces sauvages migratrices. En effet, l'estuaire est situé sur un des axes les plus empruntés par les oiseaux au cours de leur migration : la voie Est-Atlantique (Figure 19), et les zones humides de la zone sont également des sites de nidation et d'hivernage privilégiés (63).

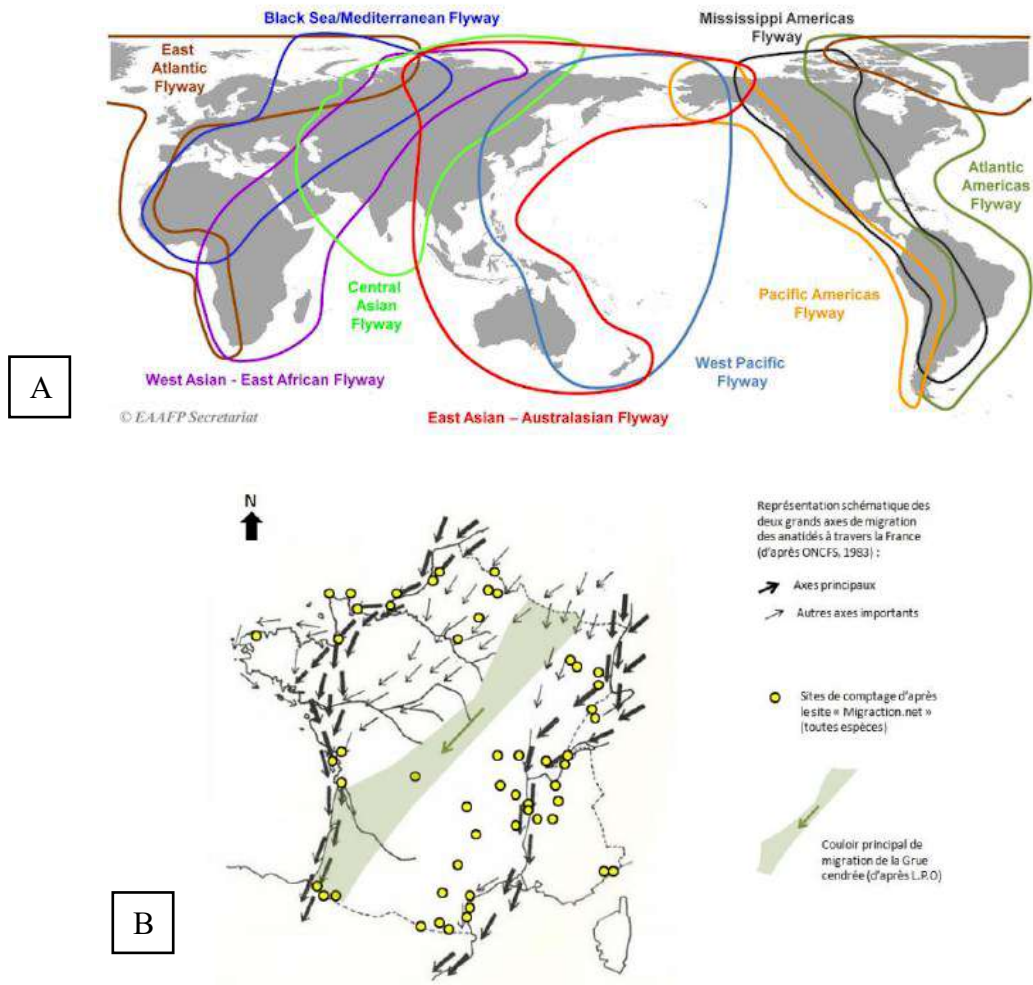


Figure 19 : Les grands axes migratoires à l'échelle mondiale (A) (61) et en France (B) (64)

L'aire d'étude a ainsi été divisée en trois zones selon des critères géographiques épidémiologiques (Figure 20) :

La première, **Confluence**, correspond à la zone où les cas de 2022 ont été signalés. Confluence se situe à la jonction entre les deux cours d'eau que sont la Garonne et la Dordogne, en faisant un territoire humide potentiellement propice au développement des populations de moustiques.

Le **bassin d'Arcachon**, deuxième zone de l'étude, se trouve à l'aplomb la voie de migration Est-Atlantique, un des huit axes de migration d'oiseaux les plus importants de la planète. Aucun cas d'infection au virus du West Nile n'a été rapporté dans cette zone. Tout comme Confluence, le bassin d'Arcachon constitue ainsi un habitat humide et protégé propice à l'installation d'oiseaux autochtones ou à la halte d'oiseaux migrateurs au cours de leur voyage. Ainsi, la situation est particulièrement favorable aux interactions entre les moustiques

vecteurs et les hôtes aviaires compétents, et donc à la mise en place du cycle de transmission des virus Usutu et du West Nile.

La troisième et dernière zone couvre le **territoire intermédiaire** entre Confluence et le bassin d'Arcachon.

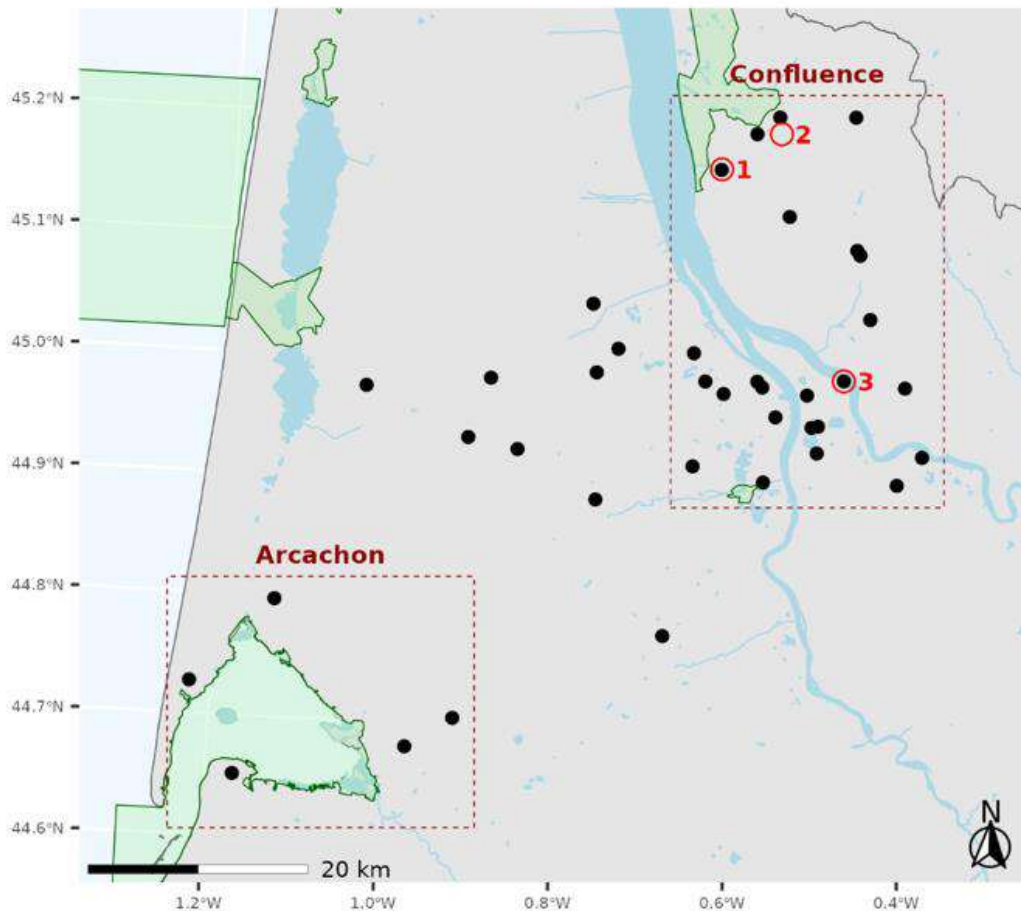


Figure 20 : Localisation des écuries réparties sur les trois zones géographiques de l'étude. (65)

(Légende : les points noirs représentent les structures où les chevaux ont été échantillonnés. Les cercles rouges correspondent aux écuries où les cas cliniques ont été signalés en 2022. Les zones vertes matérialisent les aires de protection des oiseaux sauvages).

2.2.3. Méthodes d'échantillonnage et sites de prélèvement

Pour cette enquête, des échantillons sériques d'une population de 494 chevaux, poneys et ânes adultes (âgés de plus de deux ans), ont été prélevés, dans 39 structures équestres différentes réparties sur les trois zones d'étude, et plus précisément :

- 306 équidés provenant de 25 écuries dans la zone Confluence

- 77 équidés résidant dans 5 structures dans la zone d'Arcachon
- 111 équidés venant de 9 établissements situés dans la zone intermédiaire

Le nombre d'équidés échantillonnés par structure était proportionnel à la taille de cette dernière, selon le modèle suivant :

- Structures de moins de 10 individus : prélèvement de l'ensemble des animaux
- Structures de 10 à 15 individus : prélèvement de 10 équidés
- Structures de plus de 15 individus : prélèvement de 15 équidés

L'objectif était d'allier à la fois des considérations pratiques, en limitant le nombre d'exploitations visitées et les coûts, et d'optimiser la représentativité des échantillons à l'échelle de chaque structure, afin de limiter le risque de biais de classification avec des structures qui sortiraient faussement négatives de l'étude.

Les trois cas confirmés d'infection par le WNV n'ont pas été inclus dans la cohorte d'étude, cependant deux des trois structures équestres concernées y sont représentées (*Figure 20*).

2.2.4. Critères d'inclusion des animaux prélevés

L'ensemble des animaux testés avait vécu dans l'aire d'étude au cours de l'année 2022, et était âgé d'au moins 2 ans. En effet, au-delà de considérations pratiques et de sécurité au moment du prélèvement, l'objectif était d'avoir des indications sur la circulation virale en 2022, donc les jeunes de quelques mois d'âge n'étaient pas intéressants à inclure dans notre étude. Au moment de l'enquête, aucun des équidés choisis n'était vacciné contre le virus du West Nile, et n'avait voyagé vers la côte Méditerranéenne sur les 6 dernières années. En effet, même si très peu de données sont disponibles dans la littérature sur la persistance des IgG chez le cheval, certaines études estiment qu'elles seraient décelables 5,5 ans en moyenne chez les chevaux en condition d'infection naturelle (enquêtes sérologiques menées en Camargue entre les années 2000 et 2003 (66)), et jusqu'à 6 ans après la vaccination (67). Tous les animaux étaient asymptomatiques au moment de la campagne de prélèvement.

2.2.5. Données additionnelles collectées

En complément des prélèvements sériques effectués, l'étude a été complétée par la collecte de données sur les caractéristiques individuelles des individus testés, ainsi que sur la gestion et le mode de vie des animaux dans les différents établissements. Ainsi, à l'échelle individuelle ont été recueillis l'âge, le sexe, la robe, l'activité et les antécédents médicaux de chaque équidé. Pour les structures, le type d'hébergement, l'utilisation ou non de méthodes de lutte contre les insectes (répulsifs chimiques, couvertures...), ou encore le ressenti des détenteurs d'équidés concernant la nuisance causée par les moustiques pour les humains et les animaux ont été documentés. De plus, la distance par rapport au plus proche plan d'eau et aux zones protégées (ZPS : zones de protection spéciale) ont également été recensés (*Annexe 4*). Les surfaces d'eau sont considérées comme un indicateur des zones d'habitat des moustiques vecteurs, et les ZPS comme un indicateur des zones où la biodiversité aviaire est plus élevée. En effet, les ZPS ont été créées pour la protection des espèces d'oiseaux sauvages répertoriées dans l'annexe 1 de la directive européenne sur les oiseaux (Directive 79/409/CEE), ou qui servent de zones de reproduction, de mue, d'hivernage, ou de halte pour les oiseaux migrateurs. Cinq ZPS ont été définies dans la zone d'étude autour des zones humides (*Figure 20*).

2.2.6. Prélèvement et traitement des échantillons

Afin d'obtenir les sérums nécessaires à l'enquête de séroprévalence, une prise de sang a été réalisée sur chaque équidé de la cohorte d'étude, à la veine jugulaire, à l'aide de tubes secs sous-vide. Les échantillons ont ensuite été centrifugés dans les 24h suivant le prélèvement, à 5000 rpm durant 5 minutes. Les séras ont été séparés et stockés à 4°C avant d'être envoyés au Laboratoire National de Référence (LNR) pour le virus du West Nile : l'ANSES (Maisons-Alfort, France), où ils ont été analysés.

2.2.7. Analyses sérologiques réalisées par l'ANSES

Test ELISA : (9, 68–70)

Dans un premier temps, les IgG spécifiques des principaux orthoflavivirus circulant en France : USUV, WNV et TBEV ont été recherchés dans les séras par l'intermédiaire du test ELISA Pan-Flavivirus "ID Screen Flavivirus competition" ND (Innovative Diagnostics,

Montpellier, France), selon le protocole préconisé par le concepteur (*Figure 21*). Ce test est positif par la présence d'anticorps spécifiques à l'un ou plusieurs de ces trois virus, sans qu'il ne permette pour autant de les distinguer les uns des autres. Les résultats de ce test ont été exprimés en %S/N :

- Résultat inférieur ou égal à 40% : positif.
- Résultat strictement supérieur à 50% : négatif.
- Valeurs intermédiaires, entre 40% et 50% : douteuses.

En outre, il est important de garder à l'esprit que le test "ID Screen Flavivirus competition" ND permet, d'après son concepteur, la détection d'anticorps dirigés contre WNV, TBEV et USUV, mais également contre JEV, ZIKAV, et DENV, et ce chez de nombreuses espèces : humain, chevaux, oiseaux.

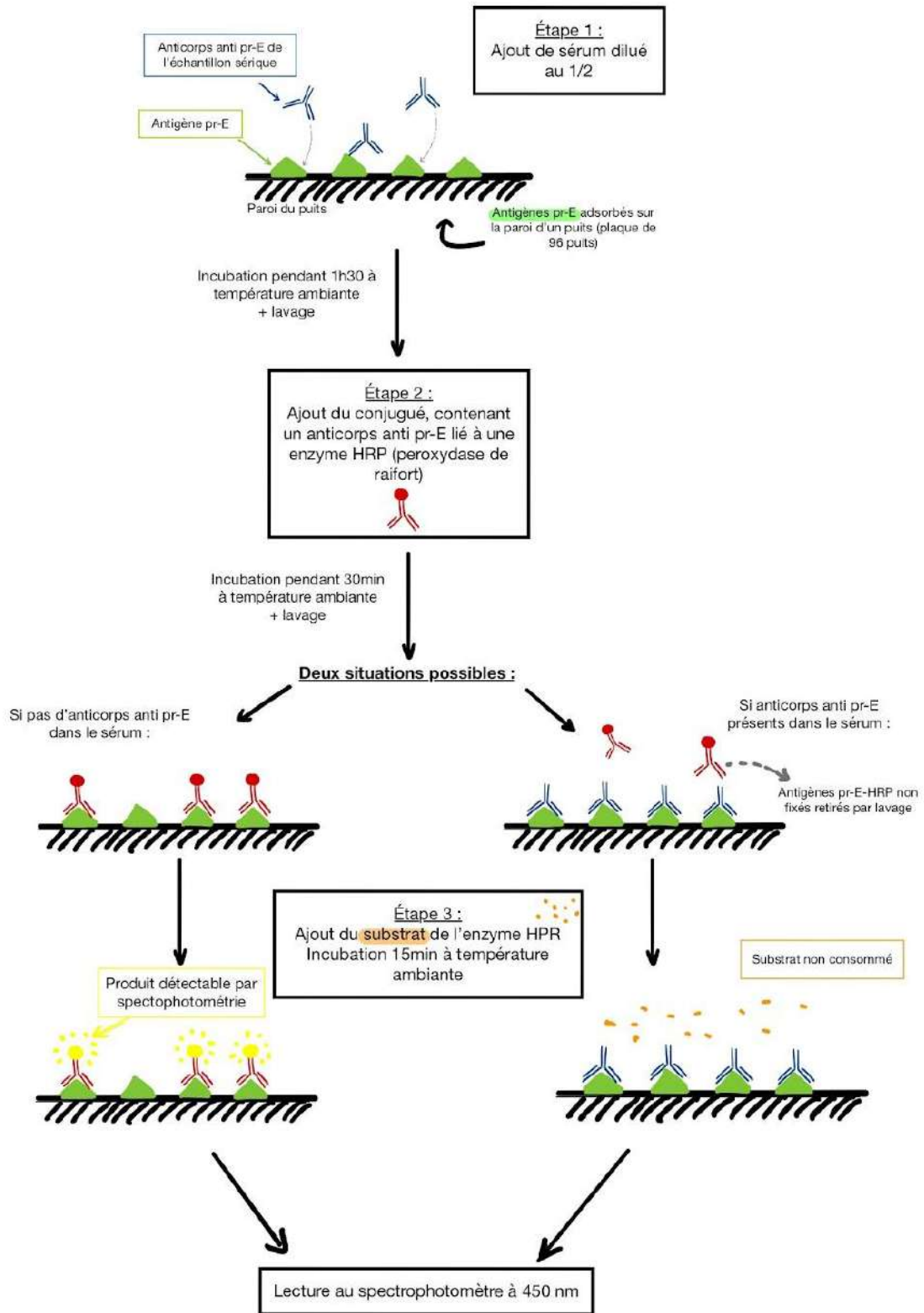


Figure 21 : schéma descriptif du principe du test sérologique ELISA "ID Screen Flavivirus competition" ND (Innovative Diagnostics, Montpellier, France) (Schéma : Margaux De Mas)

Test de séroneutralisation virale (SNT) :

Les échantillons ressortis positifs ou douteux du premier test ELISA ont ensuite été testés par séroneutralisation, afin de distinguer les anticorps dirigés contre le WNV, USUV ou le TBEV spécifiquement. Ce test a été réalisé en plaque 96 puits, selon le principe décrit précédemment, et tel que décrit dans l'étude menée par Beck et al. 2020 (Figure 22) (71) :

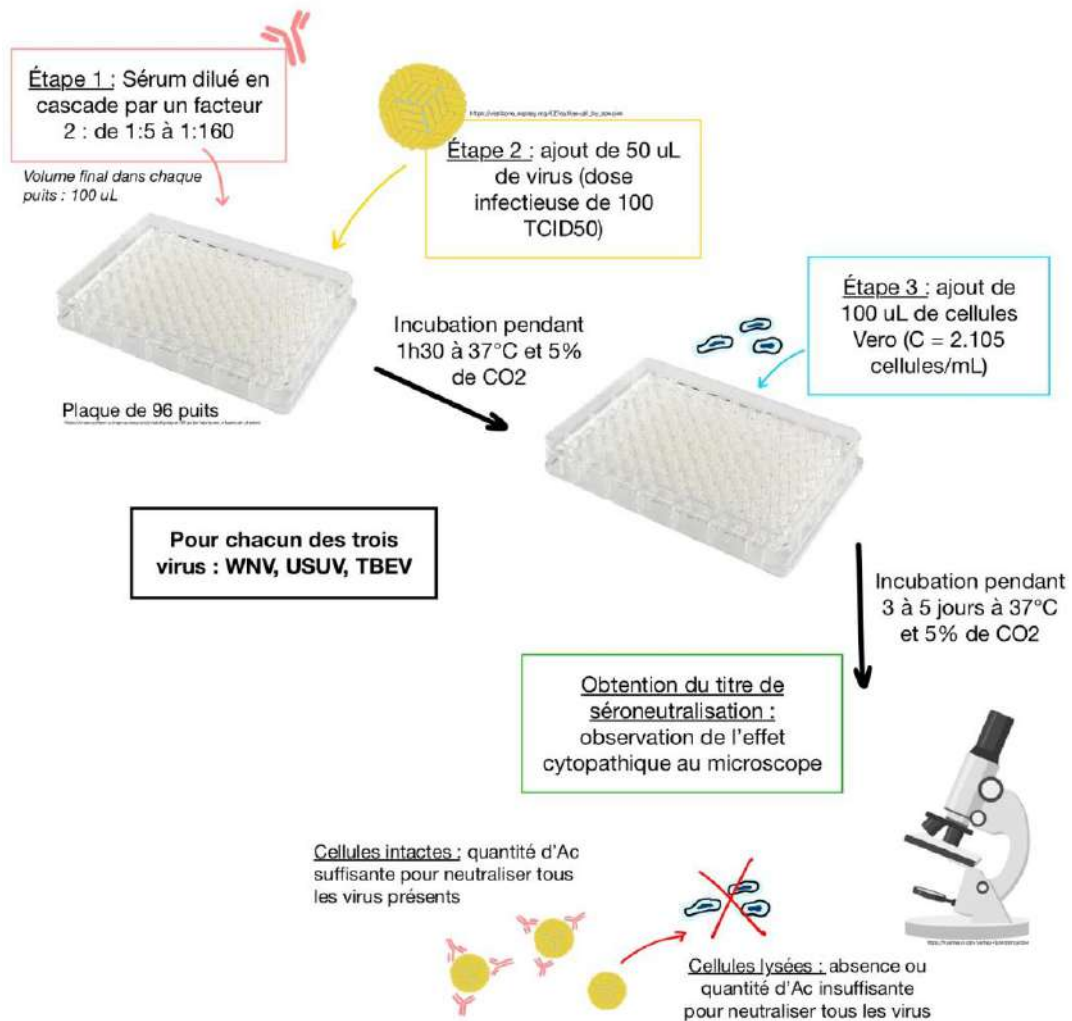


Figure 22 : schéma descriptif du principe du test de séroneutralisation utilisée, décrite dans l'étude de Beck et al. 2020 (71)

La dernière dilution sérique montrant une absence d'ECP ou une proportion d'ECP inférieure à un quart du puits a été notée comme étant celle où il existe encore une protection contre le virus, le titre conservé comme résultat correspond donc à l'inverse de cette dilution. Le seuil de positivité des tests de neutralisation virale a été fixé à un titre de 20. Les séra neutralisant plus d'un virus ont été considérés positifs pour le virus neutralisé à une dilution

quadruplement supérieure aux autres virus. Si cet écart n'était pas atteint, le sérum est considéré non différentiable en raison des réactions croisées qui peut être observées. Quant aux séra testés positifs par ELISA compétitive et négatifs par neutralisation virale, ils ont été notés négatifs pour les virus testés, le test de séroneutralisation étant considéré comme le Gold Standard.

2.2.8. Analyses statistiques

Les données ont été analysées à l'aide de modèles de régression logistique à effets mixtes, en utilisant l'écurie comme effet aléatoire. La variable à expliquer était le statut sérologique des animaux, obtenus par le test de séroneutralisation. Les effets fixes étaient l'âge des animaux (en années), le sexe (mâle ou femelle), la robe (claire ou foncée), le type d'hébergement (pâturage exclusif, ou à la fois au pâturage et en intérieur), la distance jusqu'à la surface d'eau la plus proche (qu'elle soit intermittente ou permanente, et de tout type : rivière, canal, estuaire, lac, marais, réservoir...), et la distance jusqu'à la zone de protection spéciale (ZPS) la plus proche. En partant du modèle avec tous les effets fixes, le modèle le plus parcimonieux a été sélectionné en utilisant le test du rapport de vraisemblance : celui-ci est basé sur une sélection du modèle montrant le meilleur équilibre entre les observations faites et le nombre de paramètres, par élimination progressive des variables. Malheureusement, certaines variables n'ont pu être intégrées dans l'analyse statistique car nous ne disposions pas des informations pour l'ensemble des individus considérés : c'est le cas des critères "utilisation de moyens de lutte contre les moustiques", et "présence d'autres animaux sur la structure". Afin de documenter l'association entre les résultats SNT positifs contre le WNV, l'USUV et le TBEV (c'est-à-dire le nombre d'équidés positifs pour un, deux ou trois de ces virus), une approche non paramétrique, en l'occurrence celle proposée par Vaumourin *et al.*, (2014) a permis de tester si les résultats obtenus différaient significativement de la distribution attendue sous l'hypothèse nulle de résultats positifs indépendants. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de R 4.3.3 (R Core Team 2024).

2.3. Résultats de l'enquête : prévalence des orthoflavivirus chez les équidés en Gironde

Comme cela a été précisé plus haut, le recrutement des équidés participant à l'enquête a été fait surtout selon des critères géographiques et pratiques, dépendant de la motivation des

propriétaires contactés au sein de la clientèle du CHVE de Conques. Ce faisant, les différentes catégories d'animaux choisies pour l'étude (sexe, couleur de robe, mode de vie, activité...) ont été plus ou moins représentées dans notre échantillon. Ainsi, l'enquête a concerné 494 équidés adultes que l'on peut classer :

- Par espèce : 334 chevaux (68%), 151 poneys (30%) et 9 ânes (2%)
- Par sexe : 271 mâles (55%) et 223 femelles (45%)
- Par activité : 412 équidés actifs (83%) (club, loisirs, sport, élevage, débouillage) et 82 équidés non actifs (17%) (sans activité, retraité)
- Par type d'hébergement : 328 animaux en pâture exclusive (66%), et 166 animaux en logement mixte (34%) (écurie et pâture)
- Par couleur de robe : 331 animaux de robe foncée (67%) (alezan, bai, chocolat, noir), et 163 animaux de robe claire (33%) (pie, appaloosa, aubère, blanc, crème, gris, isabelle, palomino, perlino, souris, rouan)

2.3.1. Résultats de séroprévalence

Les résultats de l'enquête ont mis en évidence la présence des trois orthoflavivirus d'intérêt dans la zone d'étude, à différents niveaux (*Tableau 2*). Parmi les 494 équidés testés, 70 ont eu un résultat ELISA positif (les résultats ELISA douteux n'ont pas été comptabilisés comme étant positifs). La grande majorité des cas positifs (64 chevaux) se situaient dans la zone de Confluence, où l'on trouvait alors une prévalence de 21% (IC 95% : 16% - 26%). En comparaison, on n'a retrouvé que 5% de séroprévalence dans la zone intermédiaire (IC 95% : 2% - 10%), et un seul cheval est ressorti positif dans la zone d'Arcachon (1%, IC 95% : 0% - 7%). Ces résultats mettent en évidence un effet zone entre Confluence et les autres territoires étudiés. D'ailleurs, une large distribution des cas positifs détectés était observée parmi les structures de Confluence, avec 80% des établissements visités touchés, alors que dans la zone intermédiaire et celle d'Arcachon, les cas positifs étaient plus localisés, dans un nombre moins important de structures, avec 44% des structures touchées dans la zone intermédiaire, et une seule structure parmi 5 dans la région d'Arcachon.

Tableau 2 : Résultats de séroprévalence obtenus par test ELISA des chevaux échantillonnés dans les trois zones d'étude : Confluence, Arcachon et la zone intermédiaire.

	Nombre de chevaux testés/nombre de structures	ELISA +	Prévalence (IC 95%)	Proportion des structures testées touchées
Confluence	306/25	64	0,21 (0,16 - 0,26)	20/25 = 80%
Arcachon	77/5	1	0,01 (0,00 - 0,07)	1/5 = 20%
Zone intermédiaire	111/9	5	0,05 (0,02 - 0,10)	4/9 = 44%
Total zones d'étude	494/39	70	0,14 (0,11 - 0,18)	25/39 = 64%

Dans un second temps, les tests de séroneutralisation (SNT) des échantillons positifs et douteux en ELISA (81 séra au total) ont permis de caractériser l'espèce virale à l'origine de la séropositivité détectée. Les résultats ont été reportés dans le *Tableau 3* : c'est dans la zone d'étude de Confluence qu'ont été retrouvés la majorité des cas séropositifs à l'un ou plusieurs des orthoflavivirus recherchés, avec 9% (IC 95% : 6% - 13%) de cas positifs au WNV, 5% (IC 95% : 3% - 8%) de cas positifs au USUV et 2% (IC 95% : 1% - 4%) d'équidés séropositifs au TBEV. Dans la zone intermédiaire, 3 cas positifs au WNV ont été détectés (3%, IC 95% : 1% - 8%), ainsi qu'un équidé positif à l'USUV (1%, IC 95% : 0% - 5%) et un cas positif au TBEV (1%, IC 95% : 0% - 5%). Enfin dans la zone d'Arcachon, seul un cas séropositif pour le WNV a été trouvé (1%, IC 95% : 0% - 7%). Il est intéressant de constater que pour 35 échantillons testés par séroneutralisation virale, soit 43% d'entre eux, aucun des trois orthoflavivirus d'intérêt n'a été mis en évidence, nous y reviendrons plus loin.

Tableau 3 : Résultats de séroprévalence obtenus par séroneutralisation virale dans les trois zones d'étude : Confluence, Arcachon et la zone intermédiaire. (L'effectif "Non caractérisable" regroupe les échantillons positifs ou douteux par ELISA et négatifs par SNT)

	WNV +	USUV +	TBEV +	Non caractérisable
	Prévalence WNV (IC 95%)	Prévalence USUV (IC 95%)	Prévalence TBEV (IC 95%)	
Confluence	27	14	6	35
	0,09 (0,06 - 0,13)	0,05 (0,03 - 0,08)	0,02 (0,01 - 0,04)	
Arcachon	1	0	0	
	0,01 (0,00 - 0,07)	0,00 (0,00 - 0,05)	0,00 (0,00 - 0,05)	
Zone intermédiaire	3	1	1	
	0,03 (0,01 - 0,08)	0,01 (0,00 - 0,05)	0,01 (0,00 - 0,05)	

Il est également intéressant de remarquer que la séropositivité à plusieurs orthoflavivirus chez un même cheval est possible et non anecdotique d'après nos résultats par SNT (Tableau 4). Ainsi, 5 chevaux étaient positifs à la fois pour WNV et USUV, correspondant à de la réaction croisée en raison de leur appartenance au même sérocomplexe. Dans ce cas, il n'a pas été possible de les différencier. Deux chevaux étaient positifs pour WNV et TBEV et un autre pour USUV et TBEV. En revanche, il n'a été mis en évidence aucun cas de séropositivité aux trois orthoflavivirus simultanément.

Tableau 4 : Séroprévalence des différentes associations de statuts sérologiques obtenus par SNT pour WNV, USUV et TBEV

WNV	USUV	TBEV	Nombre d'animaux
Positif	Positif	Positif	0
Positif	Positif	Négatif	5
Positif	Négatif	Positif	2
Positif	Négatif	Négatif	24
Négatif	Positif	Positif	1
Négatif	Positif	Négatif	9
Négatif	Négatif	Positif	4
Négatif	Négatif	Négatif	449
		TOTAL	494

Si l'on s'intéresse à la distribution géographique des cas, la *Figure 23* met en évidence une circulation des orthoflavivirus relativement généralisée dans la zone de Confluence, où la séroprévalence s'est avérée être la plus élevée. Cependant, on peut tout de même relever deux zones où la concentration semble supérieure au sein même de cette zone, d'après nos données : au niveau de la limite Sud de la ZPS colorée en vert sur la carte, ainsi que sur le plateau de l'Entre-Deux Mers, entre les bras de la Dordogne et de la Garonne, juste avant que celles-ci se rejoignent. En effet, dans ces deux zones, on trouve les structures équestres où les résultats ELISA positifs ont été les plus nombreux en regard du nombre de chevaux échantillonnés : jusqu'à 73% de chevaux séropositifs par ELISA dans une écurie. Les gérants des structures où l'on retrouve ces prévalences les plus élevées signalent tous des scores de nuisance due aux moustiques de 5/5. Cette corrélation n'est cependant pas réciproque : d'autres écuries annonçant des scores de nuisance maximum s'avèrent indemnes d'orthoflavivirus. Quant aux deux écuries incluses dans l'étude où les premiers cas cliniques de Gironde avaient été signalés en 2022, il n'a pas été mis en évidence une séroprévalence significativement supérieure par rapport aux autres structures visitées durant l'enquête. Dans la première (*repère (1), Figure 20*), un cas a été positif au WNV par SNT sur 9 chevaux testés, tandis que dans la deuxième (*repère (3), Figure 20*), les résultats par SNT ont révélé un cas positif pour le WNV ainsi qu'un cas positif pour le TBEV, sur 12 individus prélevés.

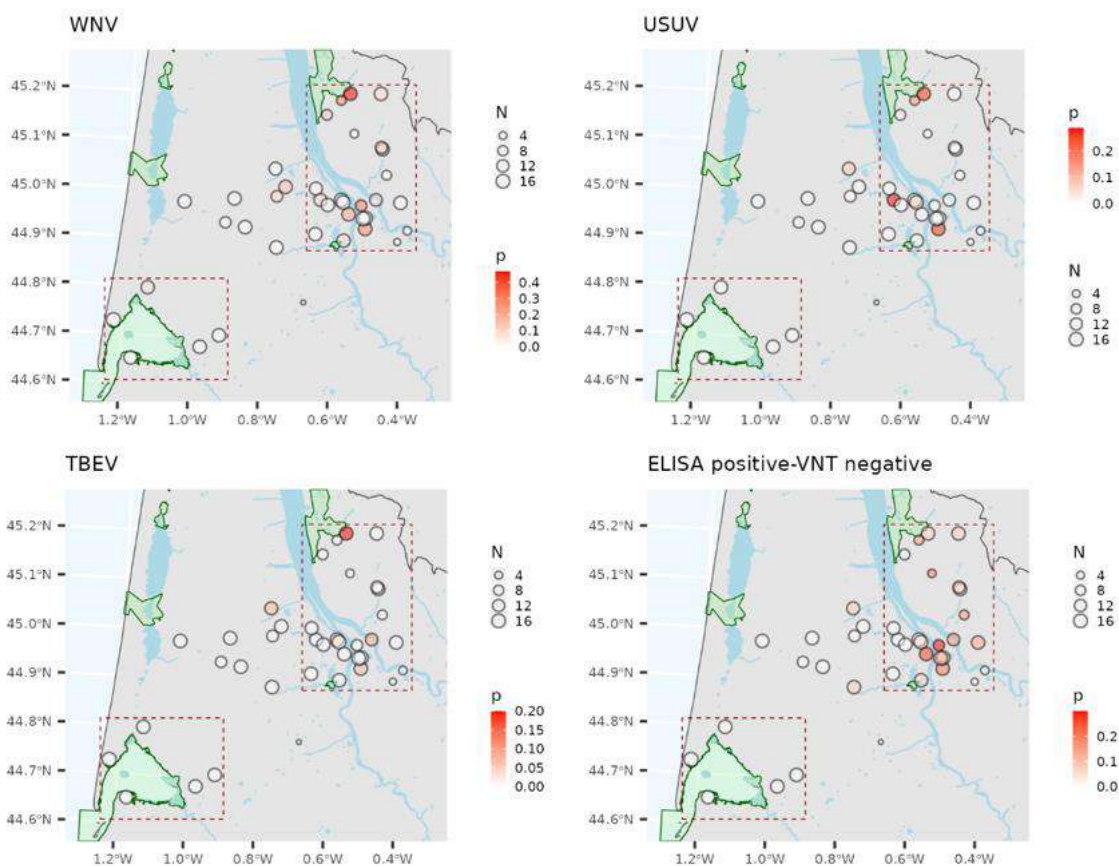


Figure 23 : Distribution des équidés séropositifs au WNV, USUV et/ou au TBEV dans les trois zones d'étude : Confluence, Arcachon et la zone intermédiaire en 2023 (65)

Les cercles représentent les structures équestres visitées, leur diamètre étant proportionnel au nombre de chevaux échantillonnés dans chacune. L'intensité de la couleur des cercles augmente avec le nombre de cas séropositifs détectés.

2.3.2. Analyses statistiques des facteurs de risque

Pour l'analyse statistique des facteurs de risque deux échelles ont été considérées : à l'échelle individuelle, nous disposons des facteurs : sexe, espèce, activité, couleur de robe, âge. A l'échelle des structures, nous avons récoltés des informations concernant le type d'hébergement, les mesures répulsives mises en place, le score de nuisance causée par les moustiques, la présence d'autres animaux sur l'exploitation, notamment les poules ou les bovins, et la proximité avec une ZPS ou une zone humide. Dans un premier temps, les analyses statistiques ont été réalisées en s'affranchissant du facteur « zone », c'est-à-dire en considérant le nombre total de cas sur le département. Pour l'ensemble des facteurs cités, individuels comme collectifs, aucune influence significative n'a pu être mise en évidence par le test du Khi^2 , pour aucun des trois orthoflavivirus. Cependant, des données concernant le score de

nuisance et la présence d'autres animaux sur la structure n'avaient pas été fournies par un quart des établissements équestres participants. Concernant le score de nuisance, il est tout de même intéressant de souligner que 80% des structures hébergeant des chevaux séropositifs pour au moins un des trois orthoflavivirus recherchés rapportaient un score de nuisance de 4 ou 5 sur l'échelle de 5 fournie.

Pour une analyse statistique plus poussée et mettant en relation les différents facteurs de risque par régression logistique à effets mixtes, seuls les statuts sérologiques pour le WNV et USUV étaient exploitables, étant donné la prévalence très faible trouvée pour le TBEV, et il a été décidé de concentrer l'analyse des facteurs de risque sur la zone de Confluence, où la majorité des cas séropositifs au WNV et USUV ont été enregistrés au cours de l'enquête. De plus, seuls les facteurs pour lesquels nous disposions de données pour l'ensemble des chevaux et structures inclus dans l'étude ont été retenus. Ainsi, l'analyse logistique multivariée des facteurs de risque a inclus d'une part à l'échelle individuelle, les facteurs : espèce, âge, espèce, activité principale, couleur de robe. A l'échelle des structures équestres d'autre part, ont été pris en compte les facteurs : proximité avec une ZPS, proximité avec une zone humide, type d'hébergement.

L'analyse statistique par sélection de modèle a montré qu'aucun des facteurs individuels n'était significativement associé à un risque plus élevé de séropositivité au WNV. En revanche, le type d'hébergement s'est révélé être associé à un risque d'infection beaucoup plus important dans le cas d'un hébergement en pâture uniquement (Odds-ratio de 4,99 (IC 95% : 1,83 - 17,47)). De même dans le modèle choisi, le risque qu'un animal soit séropositif au WNV augmentait de façon significative à mesure que l'on se rapprochait d'une ZPS (Odds-ratio de 0,85 (0,78 - 0,93)), mettant en évidence le caractère protecteur d'un éloignement par rapport à ces zones protégées (*Tableau 5*). Pour l'USUV, aucun des facteurs de risque n'a pu être retenu comme significatif.

Par ailleurs, l'analyse non-paramétrique de l'association entre les résultats de SNT positifs aux différents orthoflavivirus a révélé que des statuts sérologiques positifs à la fois pour WNV et USUV chez un même individu serait significativement associé ($p=0,006$), le nombre d'équidés séropositifs pour les deux virus (5 animaux) étant significativement plus élevé qu'attendu dans l'hypothèse nulle (IC 95 : 0 à 4 animaux).

Tableau 5: Modèle de régression logistique à effets mixtes pour les statuts sérologiques obtenus par VNT concernant le WNV dans la zone de Confluence

Variable	Valeurs	Odds-ratio (IC 95%)
Intercept (risque résiduel)		0.10 (0.03-0.27)
Type d'hébergement	Pâturage stricte	Référence
	Intérieur et pâturage	4,99 (1,83 - 17,47)
Distance à la ZPS la plus proche	Implémentation par kilomètre	0,85 (0,78 - 0,93)

3. Discussion des résultats, critiques de l'étude et perspectives pour l'avenir

3.1. **Contextualisation des résultats de l'enquête épidémiologique de 2023 et limites d'interprétation**

3.1.1. Circulation des orthoflavivirus en 2023 en Gironde, comparaison avec d'autres publications

Les orthoflavivirus West Nile, Usutu et le virus de l'encéphalite à tiques sont des virus émergents difficiles à appréhender, notamment en raison du caractère asymptomatique très majoritaire des cas infectés. L'enquête sérologique menée en 2023 dans trois zones particulièrement à risque du département de la Gironde, où les trois premiers cas équins avaient été signalés quelques mois plus tôt, ont révélé une circulation virale active dans la région, jusqu'alors insoupçonnée. Ainsi pour le WNV, les tests sérologiques ont dévoilé des séroprévalences allant de 1% dans la zone d'Arcachon, jusqu'à 9% dans la zone de Confluence, résultant en une séroprévalence moyenne de 6% sur les trois zones à risque étudiées ici. Quant au virus Usutu, il circulait également même si dans une moindre mesure, allant de 0% de séroprévalence dans la zone d'Arcachon à 5% dans la zone de Confluence, soit une séroprévalence moyenne globale de 3%. Si pour le WNV, ces résultats ne sont pas anodins, ils restent tout de même bien inférieurs aux 13,19% de séroprévalence obtenus lors d'une enquête menée entre 2016 et 2020 (92) en Camargue, où le virus du West Nile est endémique depuis plusieurs décennies. Concernant le virus Usutu, les prévalences sont comparables, avec une estimation de 3,83% en Camargue d'après cette même étude. Ainsi, les virus du West Nile et Usutu ont circulé de façon active au sein de la population équine au cours de l'année 2022,

notamment dans la zone de Confluence, qui s'avère être un « hot spot » de circulation des orthoflavivirus vectorisés par les moustiques du genre *Culex* en 2022.

Concernant le TBEV, transmis par différentes espèces de tiques, la séroprévalence moyenne sur les trois zones concernées était de 1,4% avec des chiffres allant de 0% dans le Bassin d'Arcachon à 2% dans la zone de Confluence. Au vu de ces faibles séroprévalences, il est difficile de conclure quant à la circulation ou non du TBEV dans le Sud-Ouest de la France, même s'il elle semble bel et bien exister, d'autant plus que la sélection de la population échantillonnée pour notre étude n'était pas réellement adaptée à l'étude de la circulation du TBEV dans la région spécifiquement. En effet, le TBEV est connu pour circuler dans le Nord-Est de la France, notamment dans le Jura. Or, les chevaux ayant voyagé dans cette région au cours des dernières années n'étaient pas exclus de notre échantillonnage (contrairement au pourtour méditerranéen, en considération de l'habitat des moustiques vecteurs du WNV et USUV). Cependant, au vu du faible nombre de cas séropositifs au TBEV révélés par notre enquête, il nous a été possible de nous renseigner au cas par cas des déplacements des chevaux concernés, et un seul s'est avéré avoir voyagé dans l'Est de la France par le passé. Il est donc possible d'affirmer qu'excepté un doute sur ce cheval en question, les cas séropositifs révélés lors de notre enquête sont des cas autochtones d'infection à un virus appartenant au sérocomplexe du TBEV. Des études plus ciblées et approfondies sur ce virus et sa présence chez les vecteurs (tiques) et réservoirs (rongeurs) seront nécessaires afin de caractériser et affirmer la présence et la circulation du TBEV en Gironde.

Le tableau 6 rassemble les résultats de séroprévalence obtenus dans différentes régions d'Europe et du monde concernés par la circulation des orthoflavivirus.

Tableau 6 : Comparaison des résultats de séroprévalence dans différentes régions de France, d'Europe et du monde) (3, 72–83) Le signe « - » signifie que le virus n'a pas été recherché dans les études citées.

Résultats de séroprévalence	WNV	USUV	TBEV
Gironde (trois zones confondues), 2023	6%	3%	1%
Camargue, 2016-2020	13%	4%	-
Serbie, 2011	12%	0,3%	-
Croatie, 2012	3%	-	-
Grèce, 2013	4%	-	-
Ukraine, 2013	14,5%	-	-
Albanie, 2013	22%	-	1%
Corse, 2017	9%	-	-
Pologne, 2018	15%	28%	-
Égypte, 2018	16,8%	-	-
Catalogne, Espagne, 2010-2019	5%	0,6%	0,2%
Kosovo, 2018-2019	3%	0%	-
Autriche, 2021	5%	0%	15%
Espagne du Sud-Ouest, 2021	20%	1%	-
Allemagne centrale et de l'Est, 2023	3%	0,4%	6%

Ainsi, les chiffres de séroprévalence pour le **virus West Nile** obtenus en Gironde sont comparables avec d'autres régions telles que la Catalogne, l'Autriche... Il est assez alarmant de constater que le virus circule aux frontières de la France hexagonale : il est présent en Corse, mais en Espagne, pays frontalier de la France, avec jusqu'à 20% de la population équine séropositive dans le Sud-Ouest espagnol. Les résultats obtenus en Pologne, Albanie, Ukraine, Serbie, allant de 14,5% à 22% de séropositivité, prouvent une fois de plus que le virus du West

Nile pose un enjeu sanitaire d'importance majeure qu'il est nécessaire d'appréhender à l'échelle internationale. De plus, si les résultats en Gironde sont pour l'heure inférieurs à ceux obtenus dans les études menées en Camargue et ailleurs dans le monde, il apparaît essentiel de poursuivre les recherches afin d'anticiper l'évolution de la circulation du WNV et des autres orthoflavivirus dans cette région nouvellement atteinte. Ainsi, il est intéressant de rappeler qu'une étude menée en Camargue en 2003 (72) faisait à cette époque état d'une séroprévalence de 8,1% pour le WNV (contre 13% en 2020), ce qui est comparable aux chiffres estimés dans la zone de Confluence dans notre étude de 2023. Le Sud-Ouest pourrait donc connaître la même évolution que le pourtour méditerranéen avec une éventuelle endémisation du WNV.

Concernant le **virus Usutu**, la France semble particulièrement touchée, contrairement aux autres pays où il a été recherché, exceptée la Pologne où des anticorps spécifiques du virus ont été trouvés dans presque un tiers de la population équine (7). L'enquête réalisée en Camargue entre 2016 et 2020 a révélé qu'une plus forte prévalence d'USUV était retrouvée chez les humains, chiens, moustiques et oiseaux plutôt que chez les chevaux, qui présentaient par contre davantage d'anticorps contre le WNV par rapport aux autres espèces (84). Cette différence de séroprévalence observée, entre le WNV et l'USUV qui sont pourtant vectorisés par les mêmes familles d'arthropodes, pourrait être en partie liée aux caractéristiques immunitaires des différentes espèces touchées.

Enfin, on dispose de beaucoup moins de données épidémiologiques sur la distribution du TBEV, qui circule cependant très activement dans certains pays, avec des séroprévalences de 15% en Autriche, et de 6% en Allemagne du Sud et de l'Est ((3, 83)). Cela concorde avec la répartition du TBEV en France, pour l'heure détecté seulement chez les humains dans le Nord-Est de la France et les Alpes, avec 71 cas notifiés entre mai 2021 et mai 2023 d'après les bilans les plus récents (32).

Par ailleurs, une part conséquente des tests de séroneutralisation pour le WNV, USUV et TBEV dans notre étude sont sortis négatifs (7%), alors qu'ils étaient positifs en ELISA. Comme cela a déjà été précisé, le test ELISA utilisé ressort positif en présence de WNV, USUV et TBEV, mais également de JEV, Louping LIV, DENV. D'autre part, la réactivité croisée entre les orthoflavivirus est connue et il n'est pas exclu qu'un autre orthoflavivirus encore, ou une nouvelle souche d'un orthoflavivirus connu, non caractérisés à ce jour, soit à l'origine de tests ELISA positifs. L'orthoflavivirus Bagaza (BAGV) est ainsi évoqué dans certaines études (28). Ces résultats peuvent suggérer la circulation possible de souches virales inconnues et potentiellement pathogènes en Gironde, et confirment la nécessité de poursuivre les recherches

et enquêtes épidémiologiques sur les orthoflavivirus présents en France. Enfin, les tests utilisés ne mettent pas exactement en évidence les mêmes anticorps. En effet, le ELISA permet la détection de tous les types d'anticorps IgG tandis que la SNT permet uniquement la détection des anticorps neutralisants pour lesquels la durée de persistance dans un organisme n'est à ce jour pas connue. De ce fait, les résultats positifs en ELISA et négatifs en SNT pourrait résulter soit d'une infection antérieure par WNV et/ou USUV et/ou TBEV ou bien par un orthoflavivirus non caractérisé.

3.1.2. Adéquation entre les zones de prélèvement et l'emplacement des sites positifs

Considérant le fait que cette enquête menée en 2023 était la première dans la région, la détermination des zones de prélèvement a été majoritairement centrée sur les endroits où les cas positifs avaient été déclarés en 2022, et dépendante de la motivation des écuries contactées, sans pouvoir se baser sur une étude précédente. Les résultats ont néanmoins montré que l'adéquation entre les zones d'étude et les sites positifs était relativement bonne, notamment avec la mise en évidence d'un foyer de circulation active dans la zone de Confluence, où la majorité des prélèvements ont été faits (306/494 équidés). De même, la zone de transition dans notre étude s'est révélée être également celle où la séroprévalence était intermédiaire entre Confluence et le bassin d'Arcachon, même si le nombre de chevaux prélevés a été bien moindre que dans la zone de Confluence. Cette étude permettra pour les enquêtes futures d'orienter de façon plus précise les zones d'échantillonnage, en se concentrant par exemple sur la zone de Confluence tout en s'élargissant vers la zone intermédiaire, et en y recrutant le plus d'écuries possible.

3.1.3. Limite de l'interprétation temporelle des résultats

Les tests immunologiques utilisés sont basés sur la réaction immunitaire de l'hôte en réponse à l'infection par les virus recherchés. Ils dépendent donc des caractéristiques de cette réaction, et les résultats doivent être interprétés à la lumière de ceux-ci. Ainsi, le test ELISA utilisé détecte la présence d'IgG dans le sérum de l'individu testé : ces IgG peuvent être présents suite à un contact avec le virus, mais également suite à la mise en place de la réponse vaccinale si le cheval a été vacciné. Dans notre étude, l'échantillonnage a permis d'écarter cet écueil. Cependant, une autre limite persiste. L'objectif de notre étude était d'obtenir des informations

sur la circulation du virus West Nile, ainsi que de l'USUV et du TBEV, dans les zones à risques de Gironde au cours de l'année 2022. Or, du fait de la persistance des IgG dans le sérum plusieurs années après la rencontre avec les virus (jusqu'à 5,5 ans d'après certaines études (66)), nous ne pouvons affirmer que l'ensemble des cas positifs échantillonnés au printemps 2023 aient été infectés au cours de l'année 2022. Cependant, les caractéristiques choisies pour la sélection de la cohorte échantillonnée, notamment l'absence de voyage en zone endémique sur les 6 dernières années, permettent au moins d'affirmer que les chevaux séropositifs aient été infectés sur le territoire français, où le virus n'avait pas été détecté, et plus vraisemblablement en Gironde, alors la seule région où des cas cliniques ont été recensés en dehors du Sud-Est. En effet, le premier cas symptomatique de Gironde ayant été signalé en automne 2022, on peut raisonnablement supposer que le virus du West Nile circule depuis relativement peu de saisons dans la région, et donc que les résultats de séroprévalence obtenus illustrent l'incidence de la maladie au cours de la saison 2022. En outre, l'âge des équidés n'a pas montré d'impact significatif sur les résultats obtenus au cours de notre étude, ce qui laisse supposer que la circulation du WNV dans cette zone est récente. Contrairement aux zones où le virus est présent depuis plusieurs années, il est admis que les équidés âgés présentent plus d'anticorps dirigés contre le virus que les équidés jeunes (72).

L'enquête épidémiologique de 2023 en Gironde, la toute première dans ce département, ne permet en outre pas de conclure quant à l'évolution de la circulation des orthoflavivirus dans le futur : une endémisation est-elle à prévoir, comme sur le pourtour méditerranéen, ou plutôt des épisodes épizootiques/épidémiques plus ou moins récurrents ? Si des hypothèses peuvent déjà être avancées, et développées plus loin, seule une étude de l'évolution de la séroprévalence sur plusieurs saisons de transmission permettra de corroborer un scénario plutôt qu'un autre. En effet, certaines études utilisent la répartition de la séroprévalence selon les classes d'âges des animaux touchés pour orienter les hypothèses : si les chevaux plus âgés sont davantage touchés, une allure endémique de longue date serait plus probable (72). Mais une fois encore, l'absence de connaissances précises sur la persistance des IgG spécifiques aux orthoflavivirus d'intérêt chez les chevaux est une limite à ces conclusions. Enfin, notre enquête de séroprévalence est une enquête épidémiologique transversale : les données de séroprévalence ont été collectées simultanément aux données d'exposition aux facteurs de risque.

3.1.4. Comparaison des facteurs de risques avec d'autres études sérologiques en fonction des conditions du milieu

Les résultats de notre étude concernant les facteurs potentiellement associés à une probabilité plus élevée de séropositivité pour le WNV dans la zone de Confluence ont montré que seuls des facteurs liés à l'environnement et au mode de vie des équidés, tels que le logement en pâturage exclusif et la proximité avec des zones spéciales protégées, augmentaient significativement le risque. Cela est cohérent avec les connaissances actuelles sur le cycle biologique du virus et de ses vecteurs, et les études publiées : les chevaux n'étant pas rentrés aux heures où les moustiques *Culex* sont les plus actifs, classiquement au crépuscule et jusqu'à l'aube (101, 102), sont logiquement davantage exposés à leurs piqûres. De même, les ZPS sont des aires où la biodiversité est riche et propice à la rencontre des différents acteurs et à la réalisation du cycle de transmission, d'autant plus que la concentration de cette diversité biologique dans des espaces restreints favorise l'infection d'hôtes culs-de-sac (2).

De manière surprenante, l'étude statistique n'a pas révélé de corrélation significative entre le statut sérologique des équidés aux virus West Nile et Usutu vectorisés par les moustiques et le degré de nuisance lié à ceux-ci, renseigné par les propriétaires dans le questionnaire. Cependant, ce résultat est difficilement interprétable, considérant le caractère subjectif et très individu-dépendant de cette donnée, et les renseignements très lacunaires dont nous disposons, 10 des 39 structures sollicitées n'ayant pas fourni d'informations à ce sujet.

En revanche, dans notre étude, aucune caractéristique individuelle n'a été significativement associée à l'infection par le WNV. Ce résultat est compatible avec des études menées en Camargue (72), en Allemagne (3), ou encore en Autriche (83). Néanmoins, d'autres enquêtes ont retenu l'âge et la robe comme significativement associés à un risque de séropositivité au WNV accrue : les chevaux adultes et ceux de couleur claire seraient davantage à risque d'après une étude menée dans le Sud-Ouest de l'Espagne (73). D'autres résultats obtenus au sein de la population équine en Israël entre 1997 et 2013, révèlent que l'espèce et la race seraient également des facteurs prédisposants à la piqûre par les moustiques vecteurs du virus du West Nile : les Quarter horse et chevaux Arabes étant davantage exposés, et les pur-sangs et poneys moins à risque. Cette étude conclut également à un risque plus élevé pour les chevaux de robe claire par rapport à ceux de robe foncée (85). Cependant, les auteurs restent prudents quant à ces conclusions, contredites par d'autres résultats qui montrent au contraire une séroprévalence pour le WNV plus élevée chez les chevaux de couleur foncée (86). De même pour l'influence de la race, qui peut être liée à une différence d'utilisation et de mode de vie des chevaux : les pur-sangs et autres chevaux de sport sont ainsi communément davantage protégés contre les moustiques que des chevaux de loisirs vivant en extérieur.

Concernant le virus Usutu, peu d'études se sont intéressées à l'influence des différents facteurs de risques potentiels, cependant, les chevaux « pure race » seraient plus à risque d'après l'étude menée en Espagne du Sud-Ouest citée plus haut (73). Dans notre étude en Gironde, aucun facteur de risque n'a pu être mis en évidence, mais le facteur "pure race" n'a pas été analysé.

Ainsi, les résultats des différentes études sur les facteurs de risque favorisant l'infection par le WNV et USUV ne se rejoignent pas toujours et se contredisent même parfois. Il est difficile dans l'état des connaissances actuelles de tirer des conclusions consensuelles et certaines de ces enquêtes. Cela met en lumière le manque de connaissances qui demeure aujourd'hui vis-à-vis de la biologie des orthoflavivirus et de leurs vecteurs, et la nécessité urgente d'en apprendre plus sur leur fonctionnement et modes d'expansion.

3.1.5. Les mécanismes expliquant l'émergence et l'expansion de WNV sur un territoire, application à la Gironde

L'émergence inattendue du virus du West Nile dans ce nouveau territoire français, mise en évidence par notre étude en 2023 et l'apparition de plusieurs cas cliniques équin en 2022, soulève des interrogations sur les facteurs ayant favorisé son introduction.

Introduction du virus dans un nouveau territoire :

L'hypothèse principale implique les oiseaux migrateurs. En effet, la Gironde est à l'aplomb d'une des principales routes migratoires de la planète, ainsi qu'une région de halte et de nichage importante pour de nombreuses espèces de passereaux et de rapaces, deux groupes majoritairement concernés dans le cycle de transmission du WNV (87). Des programmes d'étude ciblés sont maintenant nécessaires afin d'identifier les espèces d'oiseaux présentes en Gironde jouant le rôle d'hôtes réservoirs et amplificateurs dans cette nouvelle région touchée. Par ailleurs, les incendies dévastateurs survenus en Gironde en juillet 2022 ont été à l'origine d'une désorganisation dramatique des écosystèmes sur près de 30 000 hectares de forêts. En modifiant les interactions complexes et l'équilibre entre les organismes, ces feux de forêts ont pu favoriser l'implantation du virus et sa transmission au sein d'un écosystème fragilisé. D'autre part, les incendies jouent un rôle moteur mésestimé dans le maintien de la biodiversité et le renouvellement de la richesse interspécifique, elle-même favorable à de nouvelles interactions entre le virus et ses hôtes (88).

Plus généralement, pour comprendre l'émergence et les tendances de circulation des virus dans un territoire, il faut non seulement étudier les phénomènes d'introduction, mais également les mécanismes d'amplification, de transmission et de persistance dans le temps.

Amplification et transmission du virus du West Nile :

L'implantation du virus sur le territoire tient en premier lieu à la présence d'espèces d'oiseaux sauvages réservoir/amplificatrices et d'espèces arthropodes vectrices, les moustiques, permettant la réalisation de son cycle biologique. Cette présence dépend essentiellement des caractéristiques environnementales et climatiques des écosystèmes, en termes de températures, précipitations, fréquence des épisodes d'inondations et présence de zones humides permanentes qui favorisent à la fois la halte migratoire des oiseaux et le développement des populations de moustiques. L'année la plus propice à l'explosion de l'abondance du vecteur moustique comporte un hiver doux, un printemps sec, un été avec de longues vagues de chaleurs, suivi d'un automne orageux (2, 89). Ainsi, de façon surprenante, un printemps très sec augmenterait les risques d'occurrence d'une épidémie chez l'homme (85). En outre, l'importance de l'amplification du virus au sein d'un écosystème donné dépend de la réceptivité des espèces hôtes et vectrices présentes, ainsi que de leur résistance à l'infection et de leur potentiel d'amplification : toutes les espèces d'oiseaux, même si elles sont susceptibles d'être infectées par le virus, ne sont pas d'aussi bons hôtes réservoirs et/ou amplificateurs, cela dépendant de facteurs génétiques et d'interactions biologiques complexes (4). D'autre part, le milieu doit offrir des facteurs favorisant le contact entre les différents acteurs du cycle. La densité vecteur/hôte est déterminante, et elle-même influencée par les caractères environnementaux : la sécheresse entraîne ainsi un contact plus rapproché entre les vecteurs et les hôtes réservoirs aviaires autour des rares points d'eau. Par ailleurs, les couloirs végétaux facilitent le déplacement des moustiques sur de plus grandes distances par rapport aux espaces ouverts (2). Tous ces aspects font partie de la **capacité vectorielle**. Au sein de la capacité vectorielle, des caractéristiques inhérentes aux vecteurs permettent également d'expliquer l'amplification et les mécanismes de transmission du virus. Parmi elles, la **compétence vectorielle** désigne l'aptitude à acquérir un agent infectieux au cours d'un repas sanguin, de l'amplifier et de le retransmettre au cours d'un nouveau repas sanguin. Tous les arthropodes ne peuvent pas assurer la transmission biologique de n'importe quel agent pathogène, cette réceptivité résulte notamment de facteurs génétiques et de l'évolution adaptative entre le virus et le vecteur (2). Ainsi certains vecteurs seront hôtes préférentiels, ou accessoires s'ils interviennent seulement de façon minoritaire en raison de leur moins bonne réceptivité. La

compétence vectorielle est estimée en laboratoire, et dépend notamment de la capacité d'amplification du virus au sein de l'organisme de l'insecte et de la concentration des particules virales infectantes dans les sécrétions de celui-ci, transmissibles lors du repas sanguin. Le potentiel d'amplification, ou capacité répliquative virale (fitness), est également une caractéristique déterminante dans l'amplification et la transmission du virus. Elle tient compte de la sensibilité à l'infection du moustique et de la capacité du virus à se répliquer au sein du moustique et à franchir des barrières biologiques telles qu'intestinale et salivaire. Ce dernier critère varie en fonction de nombreux facteurs, parmi lesquels la température joue un rôle primordial : la répllication virale s'intensifie à température plus élevée. Ainsi, une étude a démontré qu'à 30°C, 90% des moustiques transmettent le virus West Nile au cours du repas, alors qu'à 18°C seulement 30% des *Culex* le transmettent (90). La température et l'humidité influenceraient également la croissance des populations de moustiques vecteurs ainsi que leur agressivité (4, 85, 90, 91). Finalement, les **préférences trophiques** du vecteur, c'est-à-dire les préférences alimentaires manifestées par le moustique pour un type d'hôte déterminé, définissent le spectre d'hôtes potentiellement impliqués dans le cycle d'infection du West Nile. En effet, en fonction de l'espèce, les moustiques sont préférentiellement ornithophiles, mammophiles ou alors peu sélectifs. Par exemple, d'après une étude réalisée dans le Sud-Ouest de l'Espagne, les espèces *Culex perexiguus*, *Cx. modestus* et *Cx. pipiens*, préférentiellement ornithophiles, permettent le maintien du cycle enzootique oiseaux-moustique dans la région, tandis que *Cx. theileri* serait impliqué seulement dans la transmission aux humains (91).

Ainsi, l'installation du cycle de transmission du virus West Nile en Gironde serait le résultat de l'existence de plusieurs facteurs concomitants : arrivée ou présence d'espèces actrices du cycle biologique viral, augmentation du potentiel de rencontre de ces espèces, évolution des paramètres climatiques favorisant le développement des vecteurs et leur capacité à transmettre le virus...

Persistance du virus du West Nile :

La situation épidémiologique en France oriente davantage vers l'hypothèse d'une persistance du virus d'une année sur l'autre plutôt que d'une réémergence annuelle. En effet, les épizooties successives sur un même territoire, comme en Camargue, et la grande proximité des souches virales mises en cause d'un épisode à l'autre (Lignage 1 du WNV détecté chez les moustiques et les chevaux depuis 2000, et la souche USUV Africa 3 depuis 2015 chez *C. pipiens* d'après une étude menée en Camargue entre 2016 et 2020) (84) supportent le scénario d'endémisation pour ces virus dans la zone d'étude.

Les hypothèses expliquant la persistance du virus West Nile sur les territoires où il circule sont diverses et plus ou moins controversées, même si plusieurs mécanismes coexistent vraisemblablement. L'infection chronique des oiseaux, avec une persistance du virus notamment dans le tissu rénal, a été mise en évidence (92) et pourrait expliquer la circulation du WNV sur plusieurs années. De même, la transmission verticale chez les moustiques, ou encore la capacité des femelles infectées à entrer en diapause hivernale sont autant d'idées avancées. La transmission vectorielle continue, sans pause d'activité hivernale, est un autre mode de persistance possible, originellement surtout dans les régions plus chaudes où les températures descendent peu, mais plus seulement aujourd'hui, avec le réchauffement climatique qui favorise le gommage des saisons et des hivers moins rigoureux à des latitudes de plus en plus hautes (92). Enfin, une biodiversité riche, ainsi que des paysages hétérogènes multiplient les interactions écologiques complexes et diversifiées, permettant l'entretien et le développement pérenne du virus (2).

Infection des hôtes culs-de-sac épidémiologiques et apparition de cas cliniques :

La circulation enzootique du virus peut être importante alors même que le risque de transmission aux chevaux et aux humains est plus faible, car cette transmission à des hôtes accidentels dépend de facteurs supplémentaires. Par exemple, les moustiques ne se nourrissent pas forcément sur l'hôte le plus abondant, en fonction de leurs préférences trophiques : une étude menée en Italie du Nord met en évidence le caractère protecteur de la présence de poules vis-à-vis de l'infection des humains et chevaux par le West Nile. De façon corrélée, il est observé qu'une diminution saisonnière de la population d'oiseaux préférée par les vecteurs augmente le risque d'infection des hôtes accidentels (93). Ainsi, le risque pour les humains et les chevaux d'être infectés par le WNV dépend des vecteurs présents sur le territoire. C'est pourquoi l'étude entomologique des espèces de moustiques présentes en Gironde et de leurs préférences trophiques est essentielle à l'appréciation du risque dans la région. Outre des critères d'espèces, la préférence des moustiques pour un individu donné au sein d'une population semble dépendre de divers critères : le choix de l'hôte se fait de façon générale grâce aux fonctions sensorielles de l'insecte, capable de percevoir des émissions tels que l'acide lactique, l'acétone ou les composés phénoliques excrétés dans la sueur des animaux cibles, de même que les variations de gaz carbonique expiré (90). Les couleurs foncées exercent également un pouvoir attractif sur le moustique. Cela corrobore les conclusions d'études montrant une séroprévalence positive pour le WNV plus élevée chez les chevaux de robe foncée, même si l'infection semble davantage mortelle chez les chevaux de robe claire d'après

cette même étude (86). Cette sensibilité accrue des chevaux de robes claires vis-à-vis du développement de signes cliniques suite à l'infection par le virus du West Nile pourrait être expliquée par un lien génétique existant entre la couleur de robe et la réponse immunitaire de l'hôte. Rappelons cependant qu'une autre étude menée en Israël citée plus haut montre une séroprévalence plus importante chez les chevaux de robe claire, même si cette conclusion pourrait être biaisée par le lien entre la robe et la race des chevaux inclus dans l'étude (85). L'influence de la robe sur les risques de piqûre est donc sujet à débat, et ne peut être étudiée comme facteur isolé expliquant les préférences trophiques des moustiques et les risques d'infection liés. Par ailleurs, la femelle moustique utilise ses pièces buccales pour le repérage thermique des capillaires sanguins, les zones à peau fine et glabres ou à poils courts sont donc préférées. Ce constat concorde bien avec la séroprévalence pour le WNV inférieure chez les poneys trouvée par la même étude menée en Israël (85).

Le risque est également lié aux probabilités de contact et de rencontre entre les vecteurs et les hôtes accidentels. L'activité des chevaux et leur mode de vie est ainsi un facteur prédisposant ou non à la rencontre avec les moustiques infectés. Cette probabilité de contact peut également connaître des variations, ce qui explique alors l'observation d'une saisonnalité dans le spectre d'hôtes touchés : l'infection et la déclaration des cas humains se concentrent par exemple en été, époque à laquelle non seulement les moustiques sont les plus actifs, mais où nous passons aussi davantage de temps en extérieur et proches des points d'eau, donc davantage au contact des vecteurs. Des facteurs génétiques propres aux espèces hôtes culs-de-sac sembleraient également jouer un rôle dans les différences de réceptivité et de sévérité de la maladie contractée. Ainsi, les chevaux de race Camargue, soumis au contact du virus du West Nile depuis des décennies, paraîtraient plus résistants au développement de la maladie, même si des cas mortels ont tout de même été recensés en 2024 (94). Des recherches complémentaires sont cependant nécessaires pour vérifier ces constats. En revanche, il est intéressant de constater que l'infection des hôtes culs-de-sac, incapable de poursuivre le cycle de transmission du virus, provoque un effet de dilution : l'impact positif ou négatif de la diversité biologique dépend de la compétence des espèces présentes : s'il y a davantage d'espèces compétentes pour transmettre le virus, cela favorise son maintien et son développement, par contre, si beaucoup d'espèces sont non compétentes, le nombre de repas des moustiques pris sur des hôtes incapables d'amplifier le virus va en conséquence diminuer le taux d'infection dans la population de moustiques, et donc le risque d'infection diminue (2).

Enfin, l'expansion rapide du virus à de nouveaux territoires et à de nouvelles espèces peut s'expliquer par l'émergence de souches plus virulentes, capables de se développer dans

l'organisme d'autres espèces, ou encore par l'apparition de mutations améliorant l'efficacité de réplication du virus chez l'hôte (95). Cela a notamment été le cas en Israël entre 1997 et 1999, ou encore lors de l'expansion fulgurante vers l'Ouest des Etats-Unis en 1999 (2). C'est d'autant plus le cas du virus Usutu, dont la virulence est très lignage-dépendante. Cette plasticité génétique propre aux virus à ARN rend ces événements mutationnels encore plus inquiétants par leur fréquence et leur imprévisibilité (96).

Enfin, avec l'évolution climatique globale et la remontée de l'aire de répartition des vecteurs, une explosion de l'ampleur des épizooties et épidémies est par ailleurs à craindre car le virus pourra atteindre des populations naïves complètement dépourvues d'immunité. Ainsi, une enquête sérologique menée au Royaume-Uni en 2019 a révélé l'absence de cas de WNV autochtones sur le territoire, les seuls équidés séropositifs ayant vraisemblablement été vaccinés. Les pays du nord de l'Europe s'intéressent ainsi de façon croissante à la situation européenne concernant la circulation du West Nile, car leurs populations non immunisées sont d'autant plus à risque. En revanche, l'étude de l'évolution de la séroprévalence au sein de ces populations totalement naïves présente un intérêt certain car elle permettra de connaître précocement l'introduction et l'expansion du WNV et d'en suivre les limites, afin de prendre des mesures préventives en conséquence (97).

3.2. Critiques et perspectives pour l'avenir

Les résultats obtenus par notre étude offrent des perspectives intéressantes et inédites quant à la situation sanitaire en France concernant le virus West Nile. Cependant, il est essentiel d'en évaluer les limites et les implications, afin d'ouvrir la voie à des recherches futures plus approfondies.

3.2.1. Représentativité de l'échantillon testé

Comme cela a été décrit plus haut, les critères de sélection des équidés inclus dans l'étude ont été choisis en fonction des objectifs de celle-ci, à savoir déterminer l'état de la circulation des orthoflavivirus WNV et USUV au cours de l'année 2022, dans les zones considérées comme les plus à risque en Gironde. Nous avons également profité de cette enquête pour étudier l'éventuelle circulation du TBEV jusqu'alors jamais décrite dans cette région. Fondamentalement, cette assertion comporte déjà un biais car ces "zones à risques" ont été

déterminées en fonction de la localisation des premiers cas cliniques de 2022, sans étude préliminaire d'orientation accessible. D'autre part, cet échantillonnage s'est évidemment heurté à des considérations pratiques qui ont limité sa réalisation : notre capacité à joindre les différentes structures, la motivation et la disponibilité des gérants de ces mêmes structures, le caractère manipulable des chevaux... Autant de facteurs qui créent inévitablement un biais d'échantillonnage, celui-ci n'étant de fait pas véritablement aléatoire. Quant à la représentativité de la cohorte étudiée, il faut prendre en compte les objectifs de l'étude : si l'on se place à l'échelle du département, la cohorte échantillonnée ne représente que près de 2% de la population équine de Gironde (494/23300 (60)). Cependant, à l'échelle des 39 structures visitées, on compte au total environ 1100 équidés : la population échantillonnée représente alors 45% de l'effectif total de ces structures (494/1100). Ainsi, notre cohorte d'étude peut, par sa taille, être considérée comme représentative des zones ciblées dans cette première enquête comme étant les plus à risque. Cela correspond bien aux fins de cette enquête 2023, qui rappelons-le, n'avait pas pour ambition de balayer l'ensemble de la Gironde, mais d'étudier l'étendue et l'intensité de circulation du WNV en 2022 à la suite des premiers cas équins autochtones en Gironde dans la zone Confluence. Il s'agissait d'une étude pilote financée sur fonds propres de chaque partenaire de l'étude (Clinique de Conques, DDPP33, LNR West Nile).

Outre les considérations sur la taille de l'échantillon, et pour des raisons pratiques également, notre cohorte n'est pas forcément représentative de la population équine de Gironde, en termes d'abondance relative des différentes espèces (seulement 3 ânes inclus dans l'étude), de couleurs de robe... Cela a également eu pour conséquence que certains facteurs de risques n'ont pu être pris en compte dans l'analyse statistique car ils n'étaient pas assez représentés au sein de notre échantillon.

3.2.2. Perspectives d'amélioration

Cette première enquête menée en 2023 constitue en fait une étude pilote qui permettra l'optimisation des protocoles et des modalités de réalisation pour le futur. Tout d'abord, le questionnaire envoyé aux propriétaires pourrait être complété afin d'en exploiter les réponses au mieux : il serait intéressant, pour les chevaux qui sont rentrés le soir en box, de savoir à quelle heure ils le sont, et surtout s'ils sont déjà en intérieur au moment du crépuscule, où les moustiques du genre *Culex* sont les plus actifs. D'autre part, concernant les informations sur l'utilisation principale des chevaux de sport, dont on peut supposer qu'ils sont davantage

déplacés pour participer aux compétitions, des informations sur ces déplacements, tels que leur distance par rapport au domicile, leurs destinations, permettraient par exemple d'explorer leur impact sur le risque d'infection en fonction des régions visitées. Par ailleurs, le score de nuisance renseigné par les propriétaires s'est avéré peu exploitable dans notre étude à cause du caractère très subjectif de ce critère. Afin de palier à cela, il serait intéressant de fournir une grille de score avec des critères précis, permettant aux participants de se situer selon des critères plus objectifs et donc comparables d'une structure à l'autre. Il serait par ailleurs pertinent de savoir à quel moment de la journée ou de la nuit les équidés sont le plus gênés par les moustiques. En outre, on pourrait envisager de caractériser précisément quels moustiques sont responsables de la nuisance rapportée : en effet en journée, les moustiques du genre *Aedes*, vecteurs du virus de la dengue, peuvent par exemple être davantage impliqués que les moustiques du genre *Culex*. Cela permettrait de mutualiser les données pour la surveillance des multiples agents pathogènes d'importance en santé humaine. La variabilité inter-enquêteur et la façon de poser les questions est aussi un biais à prendre en considération que l'on pourrait rectifier, par exemple, par la formation homogénéisée des intervenants de terrain. Si l'on veut également explorer de façon plus précise l'impact de la couleur de robe sur l'attraction des moustiques vecteurs, il s'agira d'être plus rigoureux sur la caractérisation des robes, notamment pour les robes pies, pour lesquelles la quantité de blanc sur le pelage peut énormément varier d'un cheval pie à l'autre. Finalement, un des principaux enjeux pour les prochaines études sur la circulation autochtone des orthoflavivirus en Gironde sera de sélectionner les équidés n'ayant pu s'infecter sur d'autres territoires. En effet dans notre étude, les critères ont été établis uniquement pour le WNV, seuls la vaccination WNV et un séjour en zone de circulation endémique (pourtour méditerranéen ou Espagne) au cours des 6 dernières années étaient des critères d'exclusion. Concernant le virus TBEV, les tiques dures *I. ricinus* sont retrouvées sur quasiment tout le territoire français à l'exception du sud-est de la France où il fait trop sec. Un échantillonnage adapté spécifiquement à l'étude de ce virus serait nécessaire afin d'évaluer correctement l'état de sa circulation dans le Sud-Ouest de la France, notamment en incluant des équidés ayant vécu uniquement en Gironde. De plus, dans certaines études, il a été montré que les bovins étaient de très bonnes sentinelles pour la circulation du TBEV (98). Il serait d'abord nécessaire de valider le fait que les équidés peuvent être utilisés comme sentinelles pour ce virus.

Il a d'autre part été envisagé pour notre enquête, mais non réalisable dans un premier temps, de déterminer le groupe sanguin de tous les équidés échantillonnés, afin d'évaluer si,

comme chez les humains, les moustiques *Culex* piquaient préférentiellement un groupe sanguin en particulier (99). Cela pourrait être intéressant à étudier pour les futures investigations.

Par ailleurs, il serait intéressant de poursuivre les investigations sur les interactions existant entre WNV et USUV. En effet, il a été mis en évidence que chez *C. pipiens*, une pré-infection par USUV réduit la transmission de WNV, tandis qu'une co-infection simultanée réduit la transmission d'USUV uniquement (100). Chez les hôtes aviaires, des études réalisées chez des pies ont montré qu'une infection USUV protégeait partiellement contre une infection WNV (101). Cependant, il a déjà été trouvé dans la nature des cas mortels aviaires où les deux virus étaient présents au sein des organes. C'est le cas en 2023, où un pigeon ramier en Charente-Maritime et une grive musicienne en Gironde étaient co-infectés (Données LNR West Nile). Enfin, USUV étant asymptomatique chez les équidés, il serait intéressant de savoir si une infection à USUV pouvait fournir une protection contre une infection à WNV.

Pour aller plus loin dans l'approfondissement des connaissances sur les orthoflavivirus, il serait indispensable de mener des enquêtes conjointes sur leurs circulations chez les arthropodes, par des campagnes de capture, les oiseaux, les autres espèces de mammifères, et notamment de caractériser avec précision les espèces de vecteurs présentes en Gironde, comme cela a été fait en Camargue. En effet, cela est déterminant pour prévoir l'évolution enzootique ou épizootique dans la région, le potentiel d'expansion et le risque d'infection pour l'homme et les différentes espèces hôtes potentielles. Cet apport de connaissances, associé à une étude précise des biotopes, des flux migratoires et des écosystèmes, pourra permettre de cibler de nouvelles zones potentiellement à risque et d'adapter les mesures de prévention.

3.2.3. Les orthoflavivirus : une maladie ré-émergente méritant une surveillance renforcée

3.2.3.1. *En Gironde et en France : saison 2023 et mesures mises en place depuis notre étude*

Cette première enquête de séroprévalence menée en 2023, en amont de la saison de transmission 2023, dans la population équine de Gironde proche des lieux de confirmation des premiers cas infectés dans la zone, a permis de mettre en évidence la circulation active du WNV et USUV dans des zones précises. Dans le domaine de la recherche, ces résultats préliminaires ont permis d'installer sans tarder, mi-juillet 2023, des pièges à moustiques dans la région de

Confluence afin de poursuivre les investigations sur la circulation du WNV et USUV chez les autres espèces dans cette zone à haut risque (102). L'enquête de 2023 apparaît comme une étude pilote, fournissant les premiers résultats et permettant de dessiner les prochaines pistes de recherches opérationnelles pour appréhender et contrôler au mieux l'émergence du WNV dans cette région jusqu'alors indemne. Elle met également en évidence la nécessité, mais aussi la faisabilité d'une prise en compte intégrée et globale de l'enjeu dans une logique One Health, où la coopération entre les acteurs de la santé publique humaine, animale, environnementale et des organismes de recherche et administratifs, est essentielle pour gérer au mieux ce danger nouveau dans les territoires du Sud-Ouest de la France.

D'autre part, cette enquête a contribué au lancement de mesures préventives nécessaires pour garantir la santé publique en Gironde et Charente Maritime, notamment par le renforcement des précautions prises en milieu hospitalier pour les dons du sang et dons d'organes (100). En effet, pour la première fois, les données en santé animale et environnementale ont été prise en compte pour la sécurisation des produits labiles sanguins. Jusqu'à aujourd'hui, seule la détection du premier cas humain dans un département donné déclenche les mesures de diagnostic génomique viral (DGV, recherche du génome WNV au sein des poches de sang et organes des donneurs) pour le département. En 2023, à la suite du diagnostic du premier cas humain dans la métropole de Bordeaux, le Haut Conseil de la Santé Publique (HCSP) a réuni tous les acteurs de la surveillance régaliennne du WNV, réunissant l'EFS, le Centre National de Référence (CNR) des arbovirus, le LNR West Nile,... dans le but d'établir la zone où le DGV allait être mis en place. Dans un premier temps, il était prévu de restreindre le DGV à la métropole bordelaise. Cependant, les données recueillies via l'étude des pièges à moustique précisément placés dans les écuries à forte circulation en 2022 que notre étude avait mis en évidence, ont révélé la circulation active du WNV au nord de la Gironde. De plus, grâce aux acteurs de terrain et notamment aux vétérinaires sensibilisés, des suspicions cliniques équine dans le sud de la Charente-Maritime ont été remontées. De ce fait, le DGV a été étendu à tout le département de la Gironde mais également à la Charente-Maritime par anticipation (103). Quant à la filière équine, les propriétaires et gérants de structures équestres sont depuis d'autant plus vivement encouragés à vacciner leurs animaux contre le WNV, surtout dans le secteur de Confluence où le risque apparaît a priori comme étant plus élevé.

A l'échelle de la France, selon le bilan de la saison 2022 publié par l'ANSES (*Figure 24*), ainsi que d'après les données de Santé publique France, 6 cas humains auront été recensés en Provence-Alpes-Côte d'Azur (PACA), et 9 cas équine, dont 6 localisés sur le pourtour méditerranéen, en Corse, et pour la première fois 3 en Gironde. Cette "conquête de l'Ouest"

insidieuse est confirmée par notre étude de séroprévalence, qui a révélé la circulation active jusqu'alors silencieuse, du virus West Nile dans le département girondin. D'ailleurs, le bilan de la saison suivante 2023 en est l'image : les cas rapportés ont explosé en nombre, et l'aire de répartition s'est encore élargie vers l'Ouest, avec la déclaration d'un premier cas dans le département du Gers, et l'expansion de la circulation en Gironde aux départements de Charente et Charente-Maritime. Ainsi, au cours de la saison de transmission 2023, 49 cas humains ont été recensés en Nouvelle-Aquitaine, PACA et Corse, 49 cas équins ont été diagnostiqués en Nouvelle-Aquitaine, sur le pourtour méditerranéen et dans le Gers, ainsi que 7 cas aviaires en Nouvelle-Aquitaine.

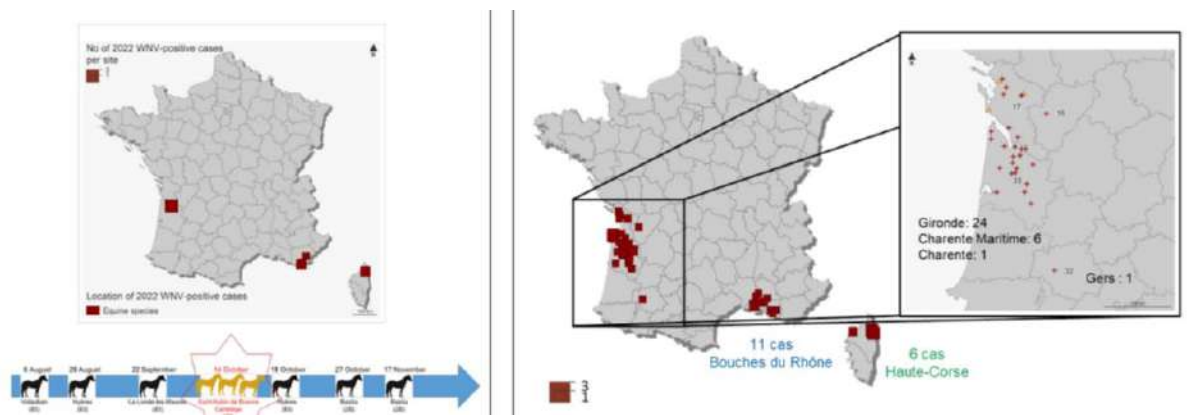


Figure 24 : Cas équins d'infection West Nile rapportés au cours des saisons de transmission 2022 et 2023 (Crédit : Laboratoire National de Référence, (104))

Si les enquêtes de séroprévalence s'avèrent ainsi être de bons indicateurs prédictifs de l'évolution du virus et de son expansion, une telle explosion du nombre de cas détectés entre 2022 et 2023 peut également en partie être expliquée par la sensibilisation accrue des professionnels et des détenteurs d'équidés quant à la détection de la maladie, permettant la déclaration de davantage de cas qui seraient auparavant passés inaperçus (100, 104). Ainsi, en cas de suspicion d'un cas d'infection aiguë par le WNV, le vétérinaire doit envoyer un échantillon de sérum à un laboratoire départemental agréé par la DGAL via sa participation à des essais inter-laboratoires organisés par le LNR West Nile, pour le diagnostic sérologique chez les équidés, où seront effectués des tests sérologiques ELISA IgG et IgM. Les délais d'obtention des résultats sont environ de 4h pour les IgG et de un jour pour les IgM. Si le résultat est positif ou douteux, ou s'il y a une forte suspicion clinique malgré un test ELISA négatif, les échantillons sont ensuite transférés à l'ANSES, au LNR West Nile pour confirmation et déclaration du cas auprès de la DGAL. Un test de séroneutralisation, réalisé au

LNR, est nécessaire lorsqu'un des deux tests ressort « douteux ». Une amplification génique par RT-PCR peut théoriquement également être réalisée sur urine (le matériel viral y serait plus longtemps détectable en raison du portage rénal du virus WNV notamment) (41). En *post-mortem*, le prélèvement d'échantillons de tissu nerveux (encéphale, moelle épinière) permet l'isolement et le séquençage de l'agent pathogène infectant, et d'en caractériser ainsi la souche.

Aujourd'hui, l'absence de tests à la fois spécifiques et sensibles, directement utilisables sur le terrain motive le développement de nouveaux tests sérologiques rapides, spécifiques et utilisant du matériel non contagieux. Une méthode de diagnostic sérologique multiplexe des infections à orthoflavivirus chez les équidés utilisant la technologie Luminex® (Biorad) a été développée par le LNR West Nile en 2016 en collaboration avec l'Institut Pasteur et montre des résultats encourageants. Fondée sur le principe de la cytométrie en flux, cette technique allie l'utilisation de microsphères magnétiques recouvertes d'antigènes (protéines virales) différenciables et une double lecture après excitation par deux lasers. La technique Luminex® a beaucoup d'avantages : le volume de sérum nécessaire est limité, ce qui est un atout notamment lors des tests réalisés chez les oiseaux. De plus, les résultats sont disponibles en 24h et pour plusieurs virus grâce à sa forme multiplex, contrairement à la séroneutralisation qui requiert plusieurs jours et la manipulation des virus en laboratoire confiné de niveau 3. Cependant, si cette méthode est prometteuse, il reste toujours difficile de discriminer les orthoflavivirus du même sérocomplexe JEV (WNV, USUV, JEV) (105). Des travaux de recherche sont en cours pour tenter d'améliorer la spécificité de ce test.

Cette volonté d'améliorer la détection du virus et de documenter sa circulation de façon plus rigoureuse et compréhensive s'est également étendue au virus Usutu, sa surveillance étant adossée à celle du WNV et réalisé par le LNR WNV. L'année 2023 a été marquée par une circulation exceptionnelle du virus parmi les populations d'oiseaux sur une large partie du territoire métropolitain français, après 5 ans de faible circulation continue (pour rappel, en 2018 une très forte épizootie due à USUV a été observée en France où plus d'une centaine de cas aviaires répartis sur 47 départements ont été diagnostiqués – LNR WNV) (*Figure 25*). Le virus a également été détecté chez l'homme en Gironde en 2022.

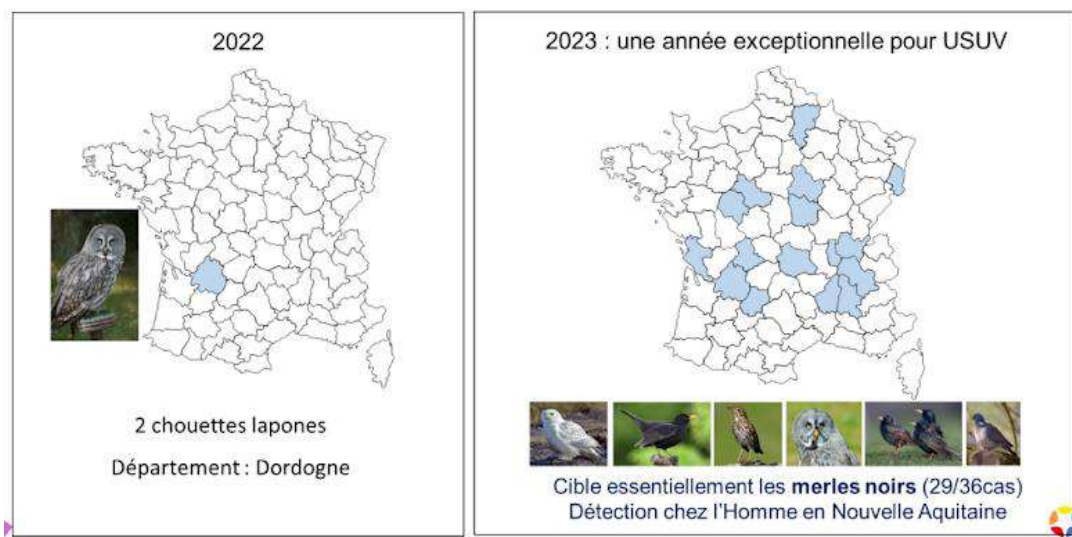


Figure 25 : Cas d'infection par le virus Usutu au cours des saisons de transmission 2022 et 2023. (Crédit : Laboratoire National de Référence (100))

Face à la flambée de cette circulation virale et à son extension marquée engendrant un risque sanitaire accru en santé humaine et animale, le Comité de Veille et d'Anticipation des Risques Sanitaires (COVARIS) a émis le 20 octobre 2023 une note, elle-même mise à jour le 18 juin 2024, faisant un état des lieux de la situation et établissant de nouvelles recommandations pour lutter contre les risques liés aux virus WN et Usutu. Le COVARIS y insiste à nouveau sur la nécessité d'une action concertée des différents acteurs nationaux dans un cadre One Health, et d'une action territorialisée, ainsi que d'une approche globale comprenant le renforcement des mesures de surveillance humaine, animale et environnementale, et des moyens d'information et de sensibilisation, la lutte anti-vectorielle, l'optimisation de la prise en charge médicale et la poursuite des recherches sur les arboviroses (106).

Les bilans des saisons de transmission du WNV, chez les équidés mais aussi les oiseaux et les humains, établis par le Laboratoire national de Référence pour le WNV et Santé Publique France durant l'année 2023, suggèrent que l'on se dirige vers une dynamique endémique du virus dans la région. La comparaison avec la situation dans les régions historiquement touchées par le WNV est également intéressante pour anticiper l'évolution possible de la circulation virale dans les zones nouvellement touchées : ainsi, le virus West Nile est endémique en Camargue depuis des décennies, cependant son allure épidémiologique n'est pas régulière, et a notamment été marquée par une période de silence entre 2004 et 2015, année marquée par une explosion de cas cliniques. La question se pose donc ici d'un phénomène de réintroduction ou plutôt d'une période de persistance à bas bruit qui aurait accompagné une diminution de l'immunité chez les populations d'hôte. Cela suivi d'une année plus propice au développement

et à la transmission du virus expliquerait ensuite la réémergence massive de la maladie. Ce phénomène ne semble pas isolé puisqu'il a également été observé en Israël en 2000 et en 2005 (85). Plusieurs scénarios sont donc envisageables quant à l'évolution de la circulation du virus du West Nile en Gironde et seule la poursuite et l'élargissement des recherches sur les années à venir permettra d'y voir plus clair.

Par ailleurs, une poursuite de l'expansion de son aire de circulation, vers le nord notamment, est également à craindre dans le futur proche, compte tenu des dynamiques actuelles, de l'évolution climatique et de la géographie/topologie. De nouvelles études sont cependant nécessaires pour anticiper plus précisément l'évolution épidémiologique de ce virus : il faudrait pour cela multiplier les années d'études, approfondir les recherches sur les phénomènes migratoires, les mécanismes de persistance des vecteurs et l'impact du réchauffement climatique sur leur répartition géographique (72).

3.2.3.2. *Enquêtes épidémiologiques et avancées scientifiques en France et à l'international en 2024*

Notre étude de séroprévalence en 2023 s'inscrit dans une dynamique actuelle globale de recherche active autour de des orthoflavivirus émergents, à toutes les échelles. En Nouvelle-Aquitaine d'une part, une enquête sérologique semblable à celle menée en Gironde a suivi en Charente-Maritime en 2024, suite à la déclaration de 6 cas équin dont le premier le 11 août 2023. Le LNR WNV a également lancé d'autres opérations de recherche sur le terrain, comme une analyse de la sérothèque du zoo de la Palmyre (2015-2023), où le WNV a été incriminé dans la perte d'une quarantaine d'oiseaux de la collection, afin de tenter de dater l'introduction du virus en Charente-Maritime. A l'échelle nationale, des enquêtes sérologiques ont été menées à travers tout le territoire chez les espèces aviaires de 18 parcs zoologiques sur 2023 et 2024 (*Données LNR West Nile*). D'autres enquêtes chez les équidés, oiseaux, bovins sont en cours de réalisation dans d'autres départements de la Nouvelle Aquitaine (Thèse FCPR de Clément Bigeard – Encadrement CHU Bordeaux et LNR West Nile).

Dans le monde entier, depuis l'année 2023, des centaines d'études ont été publiées sur le **virus West Nile** : des enquêtes de séroprévalence similaires à la nôtre révèlent la circulation du virus dans de nouveaux territoires, comme en Libye où le virus a été détecté pour la première fois chez les animaux (107), ou en Espagne dans la communauté de Madrid, parmi les populations d'oiseaux sauvages (108). Face à la montée en latitude de l'aire de distribution du WNV, les pays plus au nord s'intéressent également de plus en plus aux orthoflavivirus : une

enquête de séroprévalence menée aux Pays-Bas sur le WNV, USUV et TBEV permet un premier état des lieux de la situation épidémiologique dans le pays où un cas humain a été déclaré en 2020 (109). Elle révèle néanmoins de très faibles séroprévalences chez les chiens et les chevaux (110). Le virus du West Nile réémerge également dans des zones où il était resté silencieux pendant plusieurs années, comme en Italie où les lignages 1 et 2 ont récemment été responsables d'épizooties massives et inattendues (111, 112). La connaissance plus approfondie des facteurs de pathogénicité, des mécanismes de transmission et de persistance et des modes d'interactions entre le virus et ses hôtes est primordiale pour la mise en place de moyens de lutte efficaces contre le virus. C'est ainsi que la caractérisation plus poussée du génome du virus permet l'identification de gènes intervenant dans sa virulence et la compétence vectorielle des vecteurs (113). Par ailleurs, l'intervention de bactéries symbiotiques appartenant au microbiote du moustique *Culex* jouerait un rôle favorisant dans le développement du WNV au sein de l'organisme de ce dernier (114). Les recherches sur le développement d'outils de détection et des méthodes de surveillance sont également de plus en plus nombreuses : une étude menée au Pays-Bas démontre l'intérêt de l'utilisation d'oiseaux de basse-cour comme sentinelles de la circulation du WNV et USUV (115), tandis que de nouveaux tests de dépistage sont proposés pour simplifier et optimiser la détection précoce des infections sur le terrain et dans des régions plus reculées ou disposant de peu de moyens, comme le test sérologique multiplexe développé par l'ANSES précédemment cité, ou encore un test immunologique par micropuce à flux latéral indépendant de l'espèce, développé par une équipe néerlandaise (116).

Outre la nécessité d'améliorer nos performances diagnostiques, il apparaît également nécessaire de développer le volet préventif dans le contrôle de la maladie. La vaccination contre la fièvre de West Nile est une mesure essentielle à promouvoir dans les territoires où le virus circule. Vient alors la question de la population concernée par la vaccination : au vu de la prévalence de cas asymptomatiques séropositifs, est-il pertinent de vacciner les individus déjà séropositifs, ou sont-ils protégés à vie contre la maladie ? Si oui, combien de temps ? La littérature manque de données concernant l'espèce équine sur la persistance des défenses immunitaires contre le WNV. D'après les résultats d'une nouvelle étude menée à l'Université de Médecine vétérinaire de Budapest, les chevaux ayant développé des signes cliniques à la suite d'une infection par le WNV conservent une quantité protectrice d'anticorps neutralisants au moins 4 ans après l'infection (117). En revanche, d'après ces mêmes travaux, les chevaux séropositifs n'ayant jamais déclaré la maladie voient leur taux d'anticorps diminuer rapidement dès les premières années post-infection, il n'est donc pas possible d'assurer qu'ils seront protégés contre une potentielle réinfection. En considération de ces récentes découvertes, et

bien que l'on manque encore de recul, il paraît donc judicieux de conseiller la vaccination de tous les chevaux n'ayant jamais montré de symptômes de la fièvre de West Nile dans les régions touchées par le virus (pourtour méditerranéen en Occitanie et PACA, Corse, Nouvelle-Aquitaine), en accord avec les recommandations actuelles du RESPE ou de réaliser des dépistages annuels au LNR West Nile afin de s'assurer la présence d'anticorps neutralisants dirigés spécifiquement contre le WNV (118). La primo-vaccination consiste en deux injections à 4-6 semaines d'intervalle, avec un rappel annuel plus judicieusement au printemps. Le protocole de vaccination peut être initié dès 5 mois d'âge, et une vaccination des poulinières avant le poulinage garantit un transfert colostral des anticorps au poulain. Concernant les chevaux qui ont déjà été infectés et cliniques de la maladie, un suivi sérologique peut être envisagé afin d'évaluer l'évolution du statut immunologique et la nécessité de vacciner (119).

Il est intéressant de se placer à l'échelle internationale pour envisager les perspectives de la situation épidémiologique européenne. En effet, le WNV est aujourd'hui présent à travers l'entièreté du territoire nord-américain. Mais grâce à des politiques de vaccination de grande envergure, le nombre de cas équins déclarés est passé de 15 257 en 2002 à 116 en 2022 (120). Cela prouve qu'une mobilisation coordonnée des différents acteurs en santé publique, animale et des autorités gouvernementales, ainsi que la mise en place de stratégies basées sur la prévention vaccinale sont nécessaires et efficaces dans la prise en charge de cette nouvelle menace.

La recherche d'un vaccin humain efficace est également un enjeu majeur au vu de l'explosion des cas cliniques, et des pistes sur l'utilisation de moustiques transgéniques semblent prometteuses (121). En outre, la vaccination n'est pas la seule solution de contrôle envisagée et des outils thérapeutiques sous la forme de molécules antivirales sont également en cours d'étude (122).

Les recherches épidémiologiques sur le **virus Usutu** sont souvent menées conjointement à celles étudiant le WNV, en parallèle de recherches poussées sur la séquence génétique du virus, afin de mieux en appréhender les dynamiques d'évolution et de transmission (123).

Concernant le **virus de l'encéphalite à tiques**, le recensement des études menées au cours des derniers mois montre également un intérêt accru pour ce virus et ces mécanismes. De même que le WNV, le TBEV conquiert continuellement de nouveaux territoires, comme en Allemagne du Nord où de nouveaux foci ont été découverts récemment grâce à des études de séroprévalence parmi les animaux sauvages et domestiques (124), ou encore en Croatie (125). La communauté vétérinaire ne dispose cependant toujours pas de vaccin contre le TBEV chez

les chevaux, mais des résultats sont parus sur la performance du vaccin humain chez le cheval, sans pouvoir encore en démontrer l'efficacité (126).

3.2.3.3. Bilan de la saison 2024 en France et en Europe

En 2024, la France hexagonale a fait face à la plus forte saison de transmission depuis son arrivée sur le territoire, surtout chez les équidés, causant 89 cas dont 11 décès. (Données LNR West Nile et Santé Publique France). La majorité des cas étaient localisés sur le pourtour méditerranéen. Cependant, la saison a surtout été marquée par une extension spectaculaire de l'aire de répartition du virus, notamment en Nouvelle-Aquitaine, avec la notification d'un premier cas équin en Vendée et des cas aviaires dans le département de la Vienne (Figure 26).

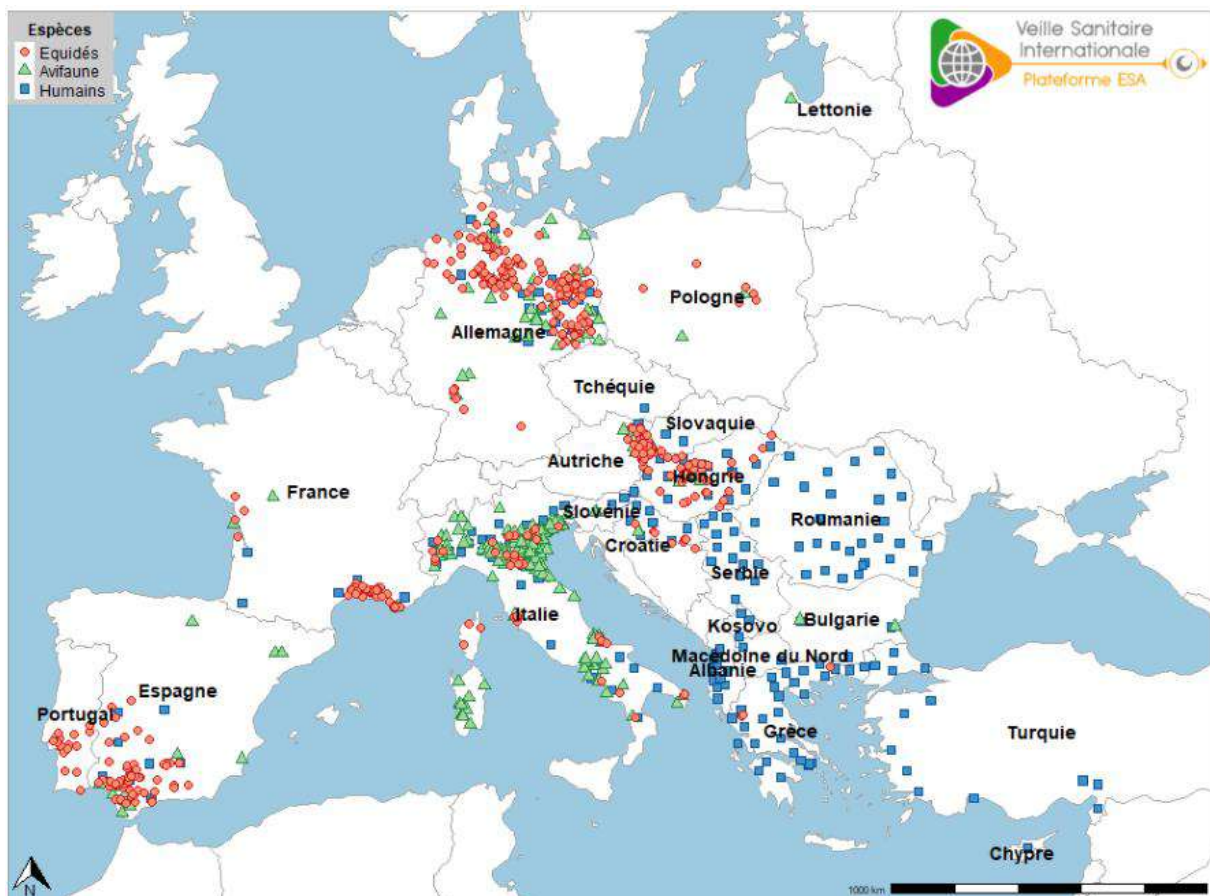


Figure 26 : Cas d'infection par le virus West Nile en 2024 pour les foyers/cas animaux et pour les cas humains dans les pays d'Europe (UE et voisins) (source : bulletins hebdomadaires Plateforme ESA) (127)

La Corse a également signalé 3 cas équins, et les DOM-TOM n'ont pas été épargnés puisque des cas équins symptomatiques ont été diagnostiqués en Guadeloupe en août 2024, et le virus a été décrit pour la première fois en Martinique en décembre. Les populations animales

n'étaient pas les seules concernées par cette expansion : le Gard, l'Hérault, le Var les Pyrénées-Atlantiques ont dû déplorer des cas humains dont un décès. La saison s'est étendue du 15 juillet 2024, avec les premiers cas équin symptomatiques dans le Var et Bouche-du-Rhône, jusqu'à fin octobre. (Figure 27)

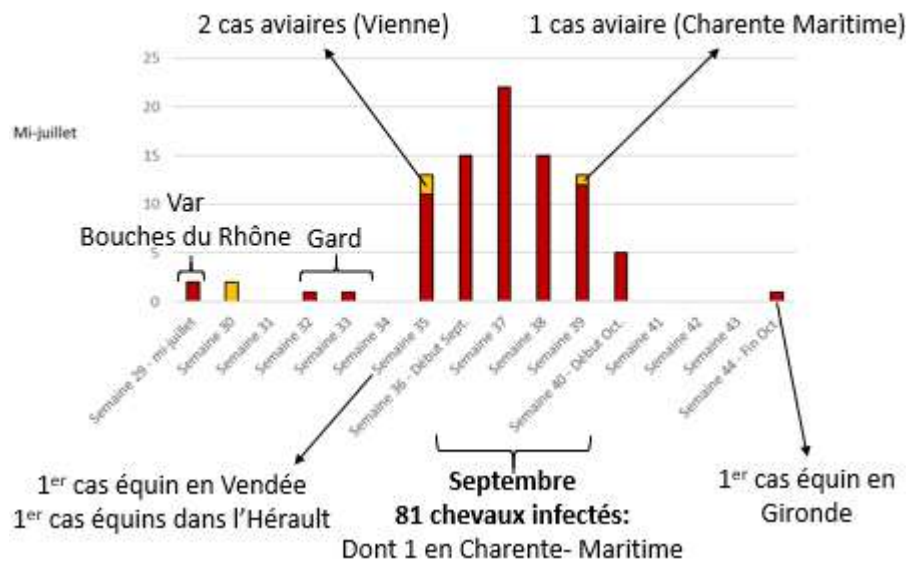


Figure 27 : Cinétique de l'épidémie West Nile en France hexagonale en 2024 chez les équidés et oiseaux basée sur la date de début des symptômes (Données LNR West Nile)

Des recherches sur les souches circulant au cours de la saison 2024 ont permis de conclure que deux souches de la lignée 2, apparentées à celle de 2023 en Gironde et celle circulant en Italie ont circulé de façon active sur le territoire cette année-là. Ces données démontrent pour la première fois la circulation du WNV lignée 2 en Camargue où seule la lignée 1 avait été décrite. De plus, les analyses phylogénétiques des souches retrouvés en Charente-Maritime et Vienne démontrent que ces dernières découlent de la souche circulante de 2023 (Données LNR West Nile).

En Gironde, un seul cas de maladie de West Nile chez les équidés a été déclaré au cours de la saison, tardivement (Figure 27). Cela pourrait peut-être s'expliquer en partie par l'ensemble des mesures mises en place suite aux résultats de l'enquête sérologique de 2023, et au travail de communication et de sensibilisation qui ont accompagné cette dernière. En effet, le WNV n'était pas même connu de beaucoup de propriétaires et acteurs de la filière équine dans cette région jusque-là épargnée. De même, la prise de conscience a également concerné les professionnels vétérinaires. Maintenant conscient de la menace, ceux-ci sont en mesure de promouvoir la vaccination, mesure de lutte essentielle, ainsi que de conseiller les détenteurs de

chevaux sur les autres plans de lutte à mettre en place, notamment contre les arthropodes vecteurs. Si la vaccination explique réellement ces chiffres en Gironde en 2024, cela est de bon augure quant à l'efficacité des mesures de prévention mises en place sur ce territoire et motive leur extension aux autres régions touchées. Enfin, la forte circulation du WNV en 2023 dans ce département où 24 cas équins ont été déclarés, il semblerait également que beaucoup de chevaux se seraient immunisés naturellement.

Hors des frontières françaises également, la saison 2024 a été marquée par une circulation importante du WNV en Europe, avec notamment un nombre de cas humains rapportés presque doublé par rapport à 2023, et une moyenne mensuelle supérieure à celle des dix dernières années. Les chiffres restent toutefois inférieurs à ceux de 2018, où on avait assisté à une explosion du nombre de cas. Cette saison 2024 se distingue également par une distribution géographique du virus encore plus large, de nouvelles régions se voyant nouvellement touchées dans la plupart des pays où le WNV circule. La même dynamique d'expansion et de circulation active est retrouvée chez les animaux aussi, avec de nombreux cas équins et aviaires rapportés en Allemagne, Espagne, Autriche, Hongrie, Italie, Portugal, Croatie, Pologne, Lettonie (dans l'ordre décroissant du nombre de cas déclarés), entre avril et novembre 2024. Le rapport de décembre 2024 de l'ECDC (European Center for Disease Prevention and Control) dont est issu ce bilan annuel précise que les chiffres publiés sont en plus très probablement sous-estimés du fait du caractère majoritairement asymptomatique de la maladie et des retards de diagnostic et de déclaration associés (128). Cette intensification de la circulation virale était attendue dès le début de la saison par les autorités de surveillance, compte tenu des conditions météorologiques favorables aux vecteurs et à une saison de transmission allongée.

Concernant les virus USUTU et TBEV, la France n'a pas encore connu ses premiers cas équins en 2024, bien que le virus TBEV circule bien en région Auvergne-Rhône-Alpes chez les humains, comme en témoignent les épisodes d'infection alimentaire par le lait cru survenues de façon sporadique, notamment en Haute-Savoie en 2024 et dans l'Ain en 2020 (129, 130). A savoir, depuis 2021, à la suite des premiers cas humains contaminés par la consommation de fromages de chèvre au lait cru en 2020 dans l'Ain, la maladie est depuis, soumise à déclaration obligatoire (131). La séroprévalence du TBEV dans les populations équines et humaines est d'autre part en augmentation chaque année juste aux frontières de la France, comme en Suisse, Allemagne, Italie, où la saison 2024 a encore été marqué par des chiffres historiques (25, 132).

3.2.4. Les autres virus à considérer pour le futur en médecine vétérinaire équine

Aujourd'hui, l'expansion des zones de circulation de virus menaçant la santé humaine et animale, la découverte de leur présence active dans des territoires où l'on ne les soupçonnait pas jusqu'alors, comme en témoigne l'étude de séroprévalence réalisée en Gironde en 2023, nous amène à redouter le futur : de nouvelles espèces virales sont découvertes chaque année, d'autres réémergent, tandis que le réchauffement climatique bouleverse les dynamiques biologiques et nos connaissances sur les vecteurs de ces agents pathogènes. Pour ne citer que l'espèce équine et outre les orthoflavivirus déjà évoqués présents sur le territoire français, d'autres agents viraux de maladies vectorielles devront être pris en compte dans le futur de la médecine vétérinaire.

Tout d'abord dans la famille des orthoflavivirus, le **virus Bagaza (BAGV)** est un exemple d'agent pathogène vectorisé sur lequel on dispose de peu de connaissances, mais qui mérite une surveillance accrue dans le contexte actuel. Le BAGV est connu depuis 1966 en Afrique centrale et a récemment été impliqué dans des épisodes fatals parmi les populations d'oiseaux d'Espagne (2010) et du Portugal (2021). C'est un virus à ARN monobrin positif vectorisé par les moustiques du genre *Culex*, comme le WNV et USUV. Le BAGV est responsable de maladie neurologique touchant majoritairement certaines espèces de perdrix, de faisans ainsi que le pigeon ramier avec un taux de mortalité s'élevant jusqu'à 30% (133). La mise en évidence du virus chez des pies bavardes au Portugal en 2023 témoigne du manque de connaissances criant concernant le spectre d'hôtes, les dynamiques de transmission et de persistance de ce virus (134). Pour l'heure néanmoins, le BAGV n'a jamais été détecté chez les mammifères en conditions naturelles, et les expériences réalisées montrent un potentiel de réplication des particules virales 100 000 fois moins importante dans des cellules de rongeurs, humains et primates par rapport à des cellules d'oiseaux et de moustiques (135). Cependant, l'implication du BAGV est évoquée dans le cadre d'une enquête de séroprévalence du WNV et de l'USUV menée sur des chevaux et des chiens dans le Sud-Est de la France en 2023 : caractérisé par une grande réactivité croisée avec ces deux derniers virus, le BAGV pourrait être proposé comme potentiel responsable des résultats ELISA positifs non caractérisables par SNT, obtenus chez 19% des chiens testés (28). De plus amples recherches sont nécessaires pour explorer le risque représenté par cet orthoflavivirus pour les différentes espèces de mammifères, dont l'homme et le cheval.

D'autres familles d'arbovirus comptent également des espèces virales d'intérêt majeur en médecine vétérinaire équine. C'est le cas de la **peste équine africaine** (136), causée par l'agent pathogène nommé AHSV (African Horse Sickness Virus). Ce virus est un orbivirus de la famille *Reoviridae*, pour lequel neuf sérotypes ont été décrits à ce jour. Distincts d'un point de vue antigénique et immunogène, ces sérotypes montrent peu d'immunité croisée, et la primo-infection par une souche est immunisante pour cette souche uniquement. Historiquement endémique en Afrique subsaharienne parmi les populations de zèbres résistants au développement de la maladie, le virus de la peste équine africaine est transmis par la piqûre de culicoïdes africains de la famille des *Ceratopogonidae*, dont la répartition s'étend aujourd'hui vers le nord avec le réchauffement climatique. De ce fait, longtemps cantonnée au continent africain, la peste équine a fait son apparition dans la Péninsule ibérique dans les années 70 et plus récemment en Thaïlande en 2020. Cette maladie touche majoritairement les équidés : les chevaux sont plus sensibles que les mules et les ânes, tandis que les zèbres jouent le rôle d'hôtes réservoirs. Les chiens sont les seuls autres mammifères chez lesquels le virus a déjà été détecté. La peste équine est une maladie à déclaration obligatoire par l'OIE et classée ADE en France (obligation de déclaration, de surveillance, de prévention, de certification et d'éradication immédiate). En effet, l'enjeu économique et sanitaire est majeur et les dommages peuvent atteindre 90% de mortalité chez les populations équines naïves. La maladie se caractérise par une atteinte des cellules endothéliales et peut prendre plusieurs formes : la forme subaiguë est frustrée et caractérisée par une fièvre peu prononcée, des muqueuses congestives, de l'apathie et de l'anorexie. La forme pulmonaire est la plus mortelle, avec jusqu'à 95% de mortalité : aux symptômes généraux s'ajoutent hyperhidrose, toux spasmodique, détresse respiratoire et jetage nasal. La deuxième forme aiguë est cardiaque, et provoque environ 50% de mortalité : le cheval présente de la fièvre, un œdème de la tête, de l'encolure, une effusion pleurale, parfois des pétéchies. La présentation clinique la plus commune est finalement une forme mixte pulmonaire et cardiaque (16). Ainsi, la présentation initiale peu spécifique de la maladie la rend de prime abord peu différenciable d'autres maladies vectorielles comme la fièvre du West Nile, l'anémie infectieuse équine et les encéphalites équines exotiques. Tout comme pour le WNV, des tests ELISA sont disponibles pour un diagnostic précoce mais ne permettent pas d'identifier la souche ni de faire la différence avec la présence d'anticorps vaccinaux. C'est pourquoi en France et dans les autres zones européennes indemnes du virus ou sous surveillance, la vaccination est soumise à autorisation préalable. Cependant, la vaccination semble la solution la plus efficace pour contrôler cette maladie et un vaccin vivant atténué contenant les souches

les plus rencontrées est largement utilisé en Afrique depuis les années 1960. Des études sont actuellement en cours pour développer un vaccin DIVA qui n'interférerait pas avec les mesures de surveillance. De même que pour la fièvre du West Nile, il n'existe pas de traitement spécifique pour la peste équine africaine, et outre la vaccination, les mesures de prévention de la maladie consistent en une réduction de l'exposition aux vecteurs (hébergement des chevaux en intérieur avant la nuit, utilisation de répulsifs, favorisation de la présence de prédateurs des culicoïdes : poissons, grenouilles, chauve-souris) (137).

Un autre groupe d'arbovirus d'importance considérable est celui des **encéphalites équines exotiques**, qui regroupe les virus de l'encéphalite équine de l'Est (EEE), l'encéphalite équine de l'Ouest (EEO), l'encéphalite équine vénézuélienne (EEV) appartenant au genre *Alphavirus* au sein de la famille *Togaviridae*, ainsi que l'orthoflavivirus de l'encéphalite équine Japonaise (JEV), déjà évoqué car appartenant au même complexe que le virus du West Nile. Ces maladies sont assez similaires au niveau des signes cliniques chez les chevaux : hyperthermie associée à une anorexie, symptômes neurologiques caractérisés par des modifications de posture (raideur, incoordination des membres, ataxie), ou du comportement et de la vigilance (agressivité, hyperexcitabilité, inconscience...). Les symptômes peuvent se dégrader et conduire à la mort de l'animal. Cependant, la durée d'incubation et la sévérité de la maladie diffère d'un virus à l'autre.

L'**encéphalite équine de l'Est** est transmise par la piqûre de moustiques du genre *Culiseta*, ornithophile, qui assure le maintien du cycle avec les oiseaux, et notamment les passereaux, hôtes réservoirs. Des vecteurs ponts mammophiles, du genre *Ochlerotatus*, et *Aedes* sont à l'origine de l'infection des mammifères. Parmi ceux-ci, les chevaux et les humains sont fréquemment touchés, mais d'autres espèces de reptiles, de mammifères domestiques et sauvages sont également concernés, et de petits rongeurs peuvent aussi être vecteurs amplificateurs, sans que la plupart ne développent de signes cliniques. Exceptionnellement, la maladie peut également se transmettre par un contact avec des animaux malades ou morts, notamment via la manipulation d'organes internes, de tissu nerveux ou de liquide céphalorachidien d'un animal infecté (130, 138). Les chevaux et les humains sont des culs-de-sac épidémiologiques pour le virus de l'EEE. L'EEE est une des plus sévères des encéphalites exotiques avec 75 à 100% de létalité. La période d'incubation est moyenne, entre 5 et 14 jours. En raison de la biologie des vecteurs, l'encéphalite équine de l'Est est majoritairement rencontrée en Amérique du Nord entre les mois de juin et d'octobre.

Le virus Madariaga correspond aux lignées II, III et IV du virus EEEV autrefois décrites. Très proche du virus de l'EEE, il sévit en Amérique centrale et du Sud. Pathogène

pour les chevaux et les humains, il circule aussi chez un grand nombre d'espèces de mammifères dont les rats et les chauves-souris, peut-être aussi chez des oiseaux et des reptiles. Ce virus émergent figure également parmi ceux sur lesquels on dispose de très peu de connaissances concernant le cycle, les hôtes et la pathogénicité, ainsi que le risque potentiel qu'ils représentent. C'est pourquoi des programmes de surveillance s'implantent aujourd'hui, notamment au Brésil où le BAGV circule activement et a été à l'origine d'une crise épizootique mortelle dans la population équine en 2019 (139).

L'encéphalite équine de l'Ouest, quant à elle, est une maladie plus rare avec des taux de mortalité faible, de l'ordre de 4% et une létalité de 20 à 50%. Vectorisé par les moustiques des genres *Culex* et *Culiseta*, le virus de l'EEO circule surtout dans les États à l'Ouest du Mississippi et en Amérique du Sud. Après une durée d'incubation de 5 à 14 jours, l'infection est le plus souvent infra-clinique (140). Récemment, le virus a été toutefois responsable d'une forte épizootie chez les équidés en Argentine où faute de moyen plus d'une centaine de cas ont été confirmés, mais d'après les remontées faites par les vétérinaires, environ 1400 chevaux auraient été touchés, avec un taux de mortalité avoisinant les 50% (Données du Laboratoire de Référence de l'Union Européenne pour les Maladies Equines, porté par l'ANSES).

Finalement, l'**encéphalite équine vénézuélienne** touche principalement l'Amérique centrale et l'Amérique du Sud, et concerne tous les équidés (chevaux, ânes, mules, zèbres) et les humains. Deux des six souches existantes, IAB et IC, sévissent de façon épizootique et sont hautement pathogènes chez les chevaux et les humains, elles peuvent se répandre très rapidement et largement dans la population équine et sont à l'origine d'épisodes pouvant s'étendre sur plusieurs mois. Les rongeurs sont les considérés comme les hôtes réservoirs. Cependant les souches épizootiques IAB et IC peuvent réaliser un cycle de transmission secondaire impliquant les chevaux et les humains comme hôtes amplificateurs et les moustiques du genre *Ochlerotatus* en sont les vecteurs préférentiels. D'autres souches, ID et IE, d'allure plutôt enzootique, ont pour espèces réservoirs des rongeurs et pour vecteurs les moustiques du genre *Culex*. Elles peuvent être à l'origine de signes cliniques chez l'humain. Si les humains et équidés sont des impasses épidémiologiques pour les autres encéphalites exotiques, cela est différent dans le cas de l'EEV : les humains et chevaux peuvent être infectants pour le moustique, et les chevaux peuvent également représenter une source d'infection à travers leurs fluides corporels, par contact direct ou aérosols (141). Dans le cas de l'EEV, la période d'incubation est courte (1-5 jours) et les taux de létalité atteignent 80%. Ainsi, les encéphalites équines de l'Ouest, de l'Est et vénézuélienne sont des zoonoses, circulant activement sur l'ensemble du territoire américain. Au 22 octobre 2024, 117 cas d'EEE sont déjà recensés par

le réseau de vigilance du RESPE pour l'année 2024 (142). Si elles n'ont pour l'heure pas atteint l'Europe, leur distribution géographique est en expansion et le risque d'importation des espèces réservoirs et des vecteurs est faible mais non négligeable, accru par les échanges internationaux de plus en plus nombreux de personnes et d'animaux, notamment d'équidés (143). En France, elles font partie des maladies à déclaration et surveillance obligatoire (catégorie E), avec obligation de certification pour l'EEV (catégorie DE) (144). Comme pour la fièvre du WNV, le diagnostic est fait le plus communément par SNT (test sérologique de référence). La PCR et l'isolement viral sur sang, sérum, LCR ou encéphale sont aussi utilisés. Il n'existe aucun traitement spécifique, et les vaccins disponibles sur le marché ne sont pas autorisés en France. Les moyens de prévention consistent là encore en une lutte anti vectorielle : aménagements du territoire (réduction des niches écologiques) ou utilisation d'insecticides et de répulsifs, sorties des équidés en dehors des périodes de forte activité des vecteurs (crépuscule), sans oublier la désinfection des locaux et du matériel surtout dans le cas de l'EEV qui peut également être transmise via les fluides corporels infectés.

Par ailleurs, l'**anémie infectieuse équine (AIE)** mérite également d'être considérée, car elle représente un danger déjà présent pour la santé équine sur le territoire français. Majoritairement transmise par la piqûre de taons et de stomoxes, c'est une maladie vectorielle qui ne peut être néanmoins incluse dans les arboviroses car les arthropodes jouent ici le rôle de vecteurs mécaniques, à la manière d'une aiguille souillée. Il n'y a aucune répllication virale dans l'organisme de ces vecteurs. Le virus de l'AIE appartient au genre *Lentivirus* de la famille des *Retroviridae*, comme le virus du VIH chez l'homme. Sa répartition géographique est mondiale et il affecte les chevaux, mulets et ânes. Ce virus circule en France sous forme de foyers sporadiques émergeant tous les uns à deux ans dans la population équine, notamment en Ardèche, dans le Var et la Dordogne. Historiquement, beaucoup de cas sont des chevaux importés d'Europe de l'Est et notamment de Roumanie où l'AIE est enzootique. L'Italie est également concernée, l'AIE y étant enzootique chez les mules, et l'Allemagne est le troisième pays le plus touché, mais seulement de façon sporadique. L'infection par le virus de l'AIE est le plus souvent asymptomatique mais la persistance du virus dans le sang des animaux infectés en fait des réservoirs contagieux à vie. La transmission naturelle par voie sanguine entre équidés reste cependant assez faible, et semble exceptionnelle via le lait, l'alimentation ou la saillie. Par contre, la transmission *in utero* est possible. Lorsque des signes cliniques apparaissent, après une période d'incubation de 10 à 15 jours et le plus souvent à la belle saison où les insectes vecteurs sont les plus actifs, ils se caractérisent par des œdèmes déclives, une perte de poids, des signes locaux oculaires, une fièvre d'origine indéterminée. Une anémie et une

thrombocytopenie sont des anomalies hématologiques fréquemment rencontrées. La mort survient en une dizaine de jours dans 80% des cas. Les survivants présenteront ensuite une forme chronique ou latente, avec la réactivation possible du virus en période de stress. Une forme suraiguë peut également être observée, bien que rarement, chez les jeunes équidés : la mort survient 1 à 3 jours après la déclaration d'une fièvre importante (>40°C) et un abattement intense. L'AIE est une maladie réglementée en France et catégorisée DE, c'est-à-dire à obligation de déclaration, surveillance et certification. Les cas doivent être déclarés à la DDETSPP, ce qui conduit à la mise sous arrêté préfectoral portant déclaration d'infection (APDI), à la conduite d'une enquête épidémiologique et à l'interdiction de mouvement dans un rayon de 3 km autour de la structure. Les animaux positifs sont mis à mort et l'Etat déclare les cas à l'OIE. Cette surveillance active et radicale est nécessaire mais compliquée en pratique, comme en a témoigné l'épisode de 2019 en Dordogne, avec l'existence de foyers secondaires parfois difficiles à mettre en évidence et lié au lien affectif entre les propriétaires et leurs chevaux. L'infection par le virus de l'AIE est par ailleurs un vice rédhibitoire pour lequel un délai de 30 jours s'applique. Ainsi, les conséquences économiques et sanitaires de cette maladie peuvent être extrêmement préjudiciables pour la filière équine, d'autant plus qu'il n'existe pas de traitement spécifique ni de vaccin. En France et en Europe, le contrôle de la maladie passe par le dépistage des étalons reproducteurs utilisés en insémination artificielle et des animaux importés ou exportés, ainsi que par la lutte contre les insectes vecteurs et de bonnes pratiques médicales (dépistage des donneurs de sang, utilisation d'aiguilles à usage unique). Le test d'immunodiffusion en gélose, ou test de Coggins, est le test de référence pour dépister la maladie (145).

Pour finir et afin d'avoir une vision la plus exhaustive possible, des virus non vectorisés sont également à l'origine de maladies neurologiques chez les équidés et doivent être pris en compte dans le diagnostic différentiel : le **virus EHV-1 responsable notamment de la forme neurologique de la rhinopneumonie**, est bien connu en France et fait l'objet de moyens de surveillance et de contrôle déjà importants. Cependant, ce n'est pas encore le cas du **virus de Borna BoDV-1**, dont l'infection provoque une maladie polio-encéphalomyélitique sporadique chez les chevaux et les moutons majoritairement, et mortelle dans 80% des cas. Ce virus n'a en effet encore jamais été détecté en France mais sa présence sérologique s'étend à de plus en plus de pays dans le monde. Ainsi, en 2017, la forme clinique était encore seulement détectée dans les zones endémiques d'Europe centrale (certaines régions d'Allemagne, Suisse, Autriche) et au Japon. Le réservoir naturel du BoDV-1 est la musaraigne bicolore, mais d'autres espèces de rongeurs et de chauve-souris peuvent être impliquées. La contamination se fait par voie

olfactive, probablement par contact direct avec des sécrétions corporelles provenant d'individus infectés. L'infection des grands mammifères (chevaux et moutons surtout, ruminants, carnivores domestiques et sauvages, singes et humains) ne semble être qu'un accident rare dans le cycle de transmission, cependant ceux-ci pourraient aussi être réservoirs et vecteurs potentiels du virus, sans que cela ne soit encore démontré. Le virus infecte l'organisme via les terminaisons nerveuses olfactives, à travers la salive, l'urine, les sécrétions lacrymales ou encore les cellules épidermiques. Une migration transneurone lui permet ensuite d'atteindre l'encéphale, où il se réplique au sein des neurones et cause des lésions multifocales. Chez le cheval, la majorité des infections sont asymptomatiques. La période d'incubation varie de deux semaines à trois mois. La phase aiguë de la maladie est marquée par des signes neurologiques variés : déficits posturaux, proprioceptifs, mouvements répétitifs, grincements de dents, marche en cercle, raideur de la nuque, nystagmus, hyperesthésie, agressivité, léthargie, somnolence ou stupeur. L'hyperthermie n'est pas toujours observée. En phase finale, des paralysies, convulsions souvent associées à des mouvements de "pousser au mur", voire un décubitus avec pédalage aboutissent à la mort de l'animal. La maladie de Borna peut être diagnostiquée par sérologie, détection d'antigène, PCR ou isolement du virus, mais aucune méthode n'est suffisante à elle seule pour effectuer un diagnostic de certitude, d'autant plus que les taux d'anticorps sont le plus souvent très faibles, et difficilement détectables en dehors de la phase aiguë de la maladie (146). Le virus de Borna possède aussi un potentiel zoonotique, et serait impliqué dans certains désordres psychiatriques, même si cette théorie est encore largement controversée (147). Récemment, en 2019, un nouveau variant a été découvert et présenterait un potentiel zoonotique létal : le **VSBV-1** (148). Par ailleurs, une étude allemande publiée en janvier 2020 met en cause le virus de Borna dans 8 cas mortels humains survenus en Allemagne entre 1999 et 2019. Ces récents événements ravivent l'attention pour ce virus dont on connaît une fois encore très peu de choses mais qui constitue sans aucun doute un risque avéré et grandissant pour la santé humaine et animale. Des recherches sont ainsi lancées pour développer de nouveaux vaccins qui protégeraient contre l'infection.

Conclusion

Les orthoflavivirus WN, USUV et TBEV sont des arbovirus zoonotiques présents en France métropolitaine, transmis principalement par les moustiques du genre *Culex* pour les deux premiers, et les tiques dures du genre *Ixodes* pour le dernier. Ces virus sont capables de circuler à bas bruit, et la grande majorité des infections chez les humains, comme chez les animaux, sont asymptomatiques, rendant leur surveillance très complexe. Seules des enquêtes épidémiologiques ciblées chez les différentes espèces concernées - notamment hommes, oiseaux, chevaux et vecteurs arthropodes - permettent d'appréhender l'évolution de ces agents pathogènes et leurs dynamiques d'extension. D'après plusieurs études, les chevaux se révèlent être de bons marqueurs sentinelles de la pression d'infection et du risque encouru par les humains d'être infectés. C'est dans cette optique que l'étude de séroprévalence transdisciplinaire sur 500 équidés du département de Gironde, dans le Sud-Ouest de la France, a été lancée par l'ANSES en étroite collaboration avec la Clinique équine de Conques et la DDPP33, suite à la déclaration des trois premiers cas équinés d'infection par le WNV dans la zone. Les résultats de cette enquête ont révélé une circulation non négligeable des virus WN et USUV parmi les équidés dans les zones à risque échantillonnées, au cours de la saison 2022, voire même avant cela. Cela a permis la mise en place immédiate de mesures de prévention et de contrôle adaptés, et le lancement de nouveaux programmes de recherche sur les autres espèces impliquées dans le cycle biologique de ces arbovirus. Ces résultats se sont par ailleurs bien avérés annonciateurs de l'évolution de l'extension virale par la suite, avec une explosion des cas sur la saison 2023 et bénéfiques pour la protection de la santé publique avec la mise en place du DGV en Gironde et Charente-Maritime par le HCSP. Cette étude a également mis en évidence la circulation potentielle d'autres orthoflavivirus jusqu'alors non caractérisés sur le territoire, et donc non identifiables par les tests de dépistage utilisés aujourd'hui. Cependant, cette première enquête d'envergure, inédite dans la région (l'étude du WNV se limitait jusqu'alors au pourtour méditerranéen), comporte des limites : nos résultats de séroprévalence ne peuvent être généralisés à l'ensemble du département girondin car l'échantillonnage réalisé a ciblé les zones considérées comme les plus à risque, dans un premier temps. Néanmoins, les résultats montrent une disparité entre les différentes zones échantillonnées, ce qui permettra d'adapter les critères de choix et d'orienter les prochaines études. D'autre part, trop de données manquaient à l'échelle individuelle et collective, concernant certains facteurs de risque, pour pouvoir réellement conclure et apporter des résultats originaux. En outre, les critères de conception de notre travail de recherche étaient essentiellement basés sur les caractéristiques

biologiques et épidémiologiques des vecteurs moustiques, en raison de la menace dominante que représente le virus WN pour la santé humaine et équine. Ces travaux sont donc moins probants pour l'étude de l'épidémiologie du virus TBEV, transmis par les tiques, qui présentent des caractéristiques biologiques tout à fait différentes.

La discussion autour de ces nouveaux éléments met en évidence les connaissances encore très lacunaires sur les dynamiques des arbovirus et ouvre la voie à d'autres questionnements et pistes de recherche. Il apparaît nécessaire de poursuivre sans attendre les recherches sur les espèces vectrices de ces agents pathogènes, qui en conditionnent l'expansion, ainsi que sur les interactions biologiques complexes en permettant l'émergence, la diffusion et la persistance sur un territoire. Nous disposons également d'encore trop peu de notions sur les facteurs individuels et collectifs déterminant le risque d'infection et la gravité des symptômes développés chez les espèces touchées, et l'exploration plus avant des mœurs des vecteurs, comme, par exemple, une possible influence du groupe sanguin de l'hôte, ou de l'existence de prédispositions génétiques, raciales... pourraient aider à prévoir les évolutions épidémiologiques et à protéger les populations les plus à risque.

Par ailleurs, le développement d'outils diagnostiques fiables et rapides est un enjeu décisif dans la lutte efficace et précoce contre cette menace. En effet, les perspectives thérapeutiques étant à ce jour très limitées lors d'infections cliniques par les orthoflavivirus étudiés dans ces travaux, la prévention, par la lutte antivectorielle et la vaccination, est l'axe de lutte à privilégier, tout en renforçant la surveillance et les recherches sur les arboviroses. Ces quatre pivots d'action sont clairement énoncés et développés par Comité de Veille et d'Anticipation des Risques Sanitaires (COVARIS) dans son avis du 18 juin 2024, sur la prise en charge de la menace West Nile (106).

Finalement, cette enquête épidémiologique transdisciplinaire met en lumière l'importance d'appréhender de façon urgente et intégrée, selon le concept One Health, ces problématiques d'expansion arbovirale zoonotique. Aujourd'hui, la pression exercée par les arboviroses sur la santé publique et animale ne cesse d'augmenter, portée par l'explosion de l'aire de distribution des vecteurs, en raison du réchauffement climatique et des échanges internationaux, et par l'émergence de nouvelles espèces virales capables d'atteindre de nouvelles espèces. C'est une course contre la montre et un véritable défi pour la recherche qui doit appréhender la biologie de virus toujours plus nombreux, des différentes espèces de vecteurs, et comprendre les interactions et facteurs épidémiologiques à l'œuvre afin d'anticiper l'évolution de la situation à l'échelle mondiale.

Un dialogue transfrontalier et même intercontinental est ainsi capital si l'on veut espérer combattre efficacement ces virus, qui ne respectent aucune démarcation. Une étude phylogénétique datant de 2024, s'intéressant aux différents lignages du WNV qui circulent à ce jour dans le Sud de l'Espagne, a ainsi mis en évidence que les provinces du sud espagnol constituent un point clé de passage pour les souches exotiques du virus de l'Afrique à l'Europe, en faisant une région clé-de-voûte dans les programmes de surveillance internationaux (149).

Bibliographie

1. MIGNÉ, Camille Victoire, BECK, Cécile, GONZALEZ, Gaëlle, LECOLLINET, Sylvie et MOUTAILLER, Sara. Quels outils pour la surveillance des arbovirus émergents au sein de leurs hôtes mammifères et vecteurs arthropodes ? *Virologie*. 1 janvier 2021. Vol. 25, n° 1, pp. 12-28. DOI 10.1684/vir.2021.0880.
2. PRADIER, Sophie. Circulation enzootique du virus West Nile en population équine : identification de facteurs de risque environnementaux en Camargue, France. *Santé publique et épidémiologie, AgroParisTech*. [en ligne]. 2010. Disponible à l'adresse: <https://pastel.archives-ouvertes.fr/pastel-006058122010AGPT0085>
3. GOTHE, Leonard M. R., GANZENBERG, Stefanie, ZIEGLER, Ute, OBIEGALA, Anna, LOHMANN, Katharina L., SIEG, Michael, VAHLENKAMP, Thomas W., GROSCHUP, Martin H., HÖRÜGEL, Uwe et PFEFFER, Martin. Horses as Sentinels for the Circulation of Flaviviruses in Eastern-Central Germany. *Viruses*. 30 avril 2023. Vol. 15, n° 5, pp. 1108. DOI 10.3390/v15051108.
4. JEANJEAN, ANNE. *Les arboviroses des équidés et l'encéphalomyélite à virus West Nile*. [en ligne]. Ecole Nationale vétérinaire de Lyon, 2002. [Consulté le 15 juin 2024]. Disponible à l'adresse: https://www2.vetagro-sup.fr/bib/fondoc/th_sout/th_pdf/2002lyon069.pdf
5. BERTAGNOLI, STÉPHANE. *Cours de Virologie, ENVT*.
6. Fièvre de West-Nile. *Respe - Réseau d'Epidémiologie-Surveillance en Pathologie Équine*. [en ligne]. [Consulté le 24 juin 2023]. Disponible à l'adresse: <https://respe.net/maladie-equine/maladies-reglementees/fievre-de-west-nile/>
7. Current ICTV Taxonomy Release | ICTV. [en ligne]. [Consulté le 15 juin 2024]. Disponible à l'adresse: <https://ictv.global/taxonomy>
8. Flavivirus group | GeneTex. [en ligne]. [Consulté le 15 juin 2024]. Disponible à l'adresse: https://www.genetex.com/Research/Overview/infectious_diseases/flavivirus
9. BECK, Cécile. Nouvelles stratégies diagnostiques et thérapeutiques contre les flavivirus neurotropes en médecine vétérinaire. *Médecine vétérinaire et santé animale. Université Paris-Saclay*. [en ligne]. 2017. Disponible à l'adresse: <https://theses.hal.science/tel-018100462017SACLS083>
10. GEROLD, Gisa, BRUENING, Janina, WEIGEL, Bettina et PIETSCHMANN, Thomas. Protein Interactions during the Flavivirus and Hepacivirus Life Cycle. *Molecular &*

Cellular Proteomics. 11 janvier 2017. Vol. 16, pp. mcp.R116.065649.

DOI 10.1074/mcp.R116.065649.

11. ZHU, Jiayang, JIANG, Liming, ZHANG, Jiayi et WEN, Jinsheng. *Overview of Experimental Findings of Animal Models for Primary Flavivirus Infection*. . 2024.

12. SCARAMOZZINO, N., CRANCE, J.-M., DROUET, C., GERMI, R., DROUET, E., JOUAN, A. et GARIN, D. Les protéases virales dans la famille des Flaviviridae. *Virologie*. 31 décembre 2002. Vol. 6, n° 6, pp. 445-54.

13. Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine. [en ligne].

[Consulté le 15 juin 2024]. Disponible à l'adresse: <https://www.academie-medecine.fr/le-dictionnaire/index.php?q=Flavivirus>

14. GUÉNET, Jean-Louis et DESPRÈS, Philippe. Les gènes OAS et la sensibilité au virus du Nil occidental. *médecine/sciences*. 1 janvier 2003. Vol. 19, n° 1, pp. 9-12.

DOI 10.1051/medsci/20031919.

15. CAVALLERI, Jessika-M. V., KORBACSKA-KUTASI, Orsolya, LEBLOND, Agnès, PAILLOT, Romain, PUSTERLA, Nicola, STEINMANN, Eike et TOMLINSON, Joy.

European College of Equine Internal Medicine consensus statement on equine flaviviridae infections in Europe. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. novembre 2022. Vol. 36, n° 6, pp. 1858-1871. DOI 10.1111/jvim.16581.

16. LECOLLINET, Sylvie, PRONOST, Stéphane, COULPIER, Muriel, BECK, Cécile, GONZALEZ, Gaëlle, LEBLOND, Agnès et TRITZ, Pierre. Viral Equine Encephalitis, a Growing Threat to the Horse Population in Europe? *Viruses*. 24 décembre 2019. Vol. 12, n° 1, pp. 23. DOI 10.3390/v12010023.

17. BECK, Cécile, JIMENEZ-CLAVERO, Miguel, LEBLOND, Agnès, DURAND, Benoît, NOWOTNY, Norbert, LEPARC-GOFFART, Isabelle, ZIENTARA, Stéphan, JOURDAIN, Elsa et LECOLLINET, Sylvie. Flaviviruses in Europe: Complex Circulation Patterns and Their Consequences for the Diagnosis and Control of West Nile Disease. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 12 novembre 2013. Vol. 10, n° 11, pp. 6049-6083. DOI 10.3390/ijerph10116049.

18. RAVANINI, P., HUHTAMO, E., ILARIA, V., CROBU, M. G., NICOSIA, A. M., SERVINO, L., RIVASI, F., ALLEGRINI, S., MIGLIO, U., MAGRI, A., MINISINI, R., VAPALAHTI, O. et BOLDORINI, R. Japanese encephalitis virus RNA detected in *Culex pipiens* mosquitoes in Italy. *Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*. 12 juillet 2012. Vol. 17, n° 28, pp. 20221. DOI 10.2807/ese.17.28.20221-en.

19. FORMOSINHO, P. et SANTOS-SILVA, M. M. Experimental infection of *Hyalomma marginatum* ticks with West Nile virus. *Acta Virologica*. 2006. Vol. 50, n° 3, pp. 175-180.
20. MUMCUOGLU, Kosta Y., BANET-NOACH, Caroline, MALKINSON, Mertyn, SHALOM, Uri et GALUN, Rachel. Argasid ticks as possible vectors of West Nile virus in Israel. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*. 2005. Vol. 5, n° 1, pp. 65-71. DOI 10.1089/vbz.2005.5.65.
21. BECK, Cécile, LEPARC GOFFART, Isabelle, FRANKE, Florian, GONZALEZ, Gaëlle, DUMAREST, Marine, LOWENSKI, Steeve, BLANCHARD, Yannick, LUCAS, Pierrick, LAMBALLERIE, Xavier de, GRARD, Gilda, DURAND, Guillaume André, ZIENTARA, Stéphan, TAPPREST, Jackie, L'AMBERT, Grégory, DURAND, Benoit, DESVAUX, Stéphanie et LECOLLINET, Sylvie. Contrasted Epidemiological Patterns of West Nile Virus Lineages 1 and 2 Infections in France from 2015 to 2019. *Pathogens (Basel, Switzerland)*. 30 octobre 2020. Vol. 9, n° 11, pp. 908. DOI 10.3390/pathogens9110908.
22. VILIBIC-CAVLEK, Tatjana, PETROVIC, Tamas, SAVIC, Vladimir, BARBIC, Ljubo, TABAIN, Irena, STEVANOVIC, Vladimir, KLOBUCAR, Ana, MRZLJAK, Anna, ILIC, Maja, BOGDANIC, Maja, BENVIN, Iva, SANTINI, Marija, CAPAK, Krunoslav, MONACO, Federica, LISTES, Eddy et SAVINI, Giovanni. Epidemiology of Usutu Virus: The European Scenario. *Pathogens (Basel, Switzerland)*. 26 août 2020. Vol. 9, n° 9, pp. 699. DOI 10.3390/pathogens9090699.
23. *Encéphalites à TBE, X. Argemi*. [en ligne]. [Consulté le 20 juin 2025]. Disponible à l'adresse: <https://www.infectiologie.com/UserFiles/File/jni/2018/com/jni2018-tbe-argemi.pdf>
24. MAGOURAS, Ioannis, SCHOSTER, Angelika, FOUCHÉ, Nathalie, GERBER, Vinzenz, GROSCHUP, Martin H., ZIEGLER, Ute, FRICKER, Raffael, GRIOT, Christian et VÖGTLIN, Andrea. Neurological disease suspected to be caused by tick-borne encephalitis virus infection in 6 horses in Switzerland. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. novembre 2022. Vol. 36, n° 6, pp. 2254-2262. DOI 10.1111/jvim.16533.
25. DE HEUS, Phebe, BAGÓ, Zoltán, WEIDINGER, Pia, LALE, Dilara, TRACHSEL, Dagmar S., REVILLA-FERNÁNDEZ, Sandra, MATIASEK, Kaspar et NOWOTNY, Norbert. Severe Neurologic Disease in a Horse Caused by Tick-Borne Encephalitis Virus, Austria, 2021. *Viruses*. 29 septembre 2023. Vol. 15, n° 10, pp. 2022. DOI 10.3390/v15102022.
26. STEININGER, Philipp, ENSSER, Armin, KNÖLL, Antje et KORN, Klaus. Results of Tick-Borne Encephalitis Virus (TBEV) Diagnostics in an Endemic Area in Southern

Germany, 2007 to 2022. *Viruses*. 30 novembre 2023. Vol. 15, n° 12, pp. 2357.

DOI 10.3390/v15122357.

27. MACKENZIE, John S., WILLIAMS, David T., VAN DEN HURK, Andrew F., SMITH, David W. et CURRIE, Bart J. Japanese Encephalitis Virus: The Emergence of Genotype IV in Australia and Its Potential Endemicity. *Viruses*. 9 novembre 2022. Vol. 14, n° 11, pp. 2480. DOI 10.3390/v14112480.

28. LAIDOUDI, Younes, DURAND, Guillaume, WATIER-GRILLOT, Stéphanie, DESSIMOULIE, Anne-Sophie, LABARDE, Claire, NORMAND, Thomas, ANDRÉO, Virginie, GUÉRIN, Patrick, GRARD, Gilda et DAVOUST, Bernard. Evidence of Antibodies against the West Nile Virus and the Usutu Virus in Dogs and Horses from the Southeast of France. CASAL, Jordi (éd.), *Transboundary and Emerging Diseases*. 24 mars 2023.

Vol. 2023, pp. 1-8. DOI 10.1155/2023/8779723.

29. 2018, en France : record de circulation du virus Usutu. [en ligne].

[Consulté le 15 juin 2024]. Disponible à l'adresse:

https://professionnels.ofb.fr/sites/default/files/pdf/RevueFS/FauneSauvage324_2019_Art2.pdf

30. ARS NOUVELLE-AQUITAINE. Communiqué de presse : confirmation d'une infection autochtone à virus Usutu (secteurs des Landes et de Gironde). [en ligne]. 9 novembre 2022. [Consulté le 15 juin 2024]. Disponible à l'adresse: <https://www.nouvelle-aquitaine.ars.sante.fr/media/102015/download?inline>

31. *2020-09-note_bilan_TBEV_V3_0.pdf*. [en ligne]. [Consulté le 20 juin 2025].

Disponible à l'adresse: https://www.plateforme-esa.fr/sites/default/files/2021-11/2020-09-note_bilan_TBEV_V3_0.pdf

32. SPF. Encéphalites à tiques (TBE) en France. Bilan des cas déclarés de mai 2021 à mai 2023. [en ligne]. [Consulté le 15 juin 2024]. Disponible à l'adresse:

<https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-a-transmission-vectorielle/encephalite-a-tiques/documents/encephalites-a-tiques-tbe-en-france.-bilan-des-cas-declares-de-mai-2021-a-mai-2023>

33. The European Union One Health 2022 Zoonoses Report - - 2023 - EFSA Journal - Wiley Online Library. [en ligne]. [Consulté le 15 juin 2024]. Disponible à l'adresse:

<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2023.8442>

34. Surveillance, prevention and control of West Nile virus and Usutu virus infections in the EU/EEA. *EFSA Supporting Publications*. [en ligne]. septembre 2023. Vol. 20, n° 9. [Consulté le 20 juin 2025]. DOI 10.2903/sp.efsa.2023.EN-8242.

35. Tick-borne encephalitis Annual Epidemiological Report 2022. . 2022.

36. HAGLUND, Mats et GÜNTHER, Göran. Tick-borne encephalitis--pathogenesis, clinical course and long-term follow-up. *Vaccine*. 1 avril 2003. Vol. 21 Suppl 1, pp. S11-18. DOI 10.1016/s0264-410x(02)00811-3.
37. HABARUGIRA, Gervais, SUEN, Willy W., HOBSON-PETERS, Jody, HALL, Roy A. et BIELEFELDT-OHMANN, Helle. West Nile Virus: An Update on Pathobiology, Epidemiology, Diagnostics, Control and « One Health » Implications. *Pathogens (Basel, Switzerland)*. 19 juillet 2020. Vol. 9, n° 7, pp. 589. DOI 10.3390/pathogens9070589.
38. Encéphalite à tiques. [en ligne]. 26 septembre 2023. [Consulté le 22 juillet 2025]. Disponible à l'adresse: <https://vaccination-info-service.fr/Les-maladies-et-leurs-vaccins/Encephalite-a-tiques>
39. NAVEED, Ahsan, EERTINK, Lianne G., WANG, Dan et LI, Feng. Lessons Learned from West Nile Virus Infection: Vaccinations in Equines and Their Implications for One Health Approaches. *Viruses*. 14 mai 2024. Vol. 16, n° 5, pp. 781. DOI 10.3390/v16050781.
40. LAMBERT, MORGANE. *Évaluation des coûts liés à la surveillance et à la lutte et des pertes engendrées par l'épizootie de West Nile de 2015 en Camargue dans la filière équine*. . 2018.
41. LUSTIG, Yaniv, SOFER, Danit, BUCRIS, Efrat Dahan et MENDELSON, Ella. Surveillance and Diagnosis of West Nile Virus in the Face of Flavivirus Cross-Reactivity. *Frontiers in Microbiology*. 2018. Vol. 9, pp. 2421. DOI 10.3389/fmicb.2018.02421.
42. PROTEQ WEST NILE® Suspension injectable pour chevaux - Med'Vet. [en ligne]. [Consulté le 20 juin 2025]. Disponible à l'adresse: <https://med-vet.fr/produits/medicament/proteq-west-nile-r-suspension-injectablechevaux/de369ee8-e59e-4538-be33-af97c2e56188>
43. SANDRET, Charlotte. West Nile : vacciner ou pas ? *AVEF*. [en ligne]. 31 mars 2025. [Consulté le 20 juin 2025]. Disponible à l'adresse: <https://avef.fr/west-nile-vacciner-ou-pas/>
44. JOÓ, Kinga, BAKONYI, Tamás, SZENCI, Ottó, SÁRDI, Sára, FERENCZI, Emőke, BARNA, Mónika, MALIK, Péter, HUBALEK, Zdenek, FEHÉR, Orsolya et KUTASI, Orsolya. Comparison of assays for the detection of West Nile virus antibodies in equine serum after natural infection or vaccination. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. janvier 2017. Vol. 183, pp. 1-6. DOI 10.1016/j.vetimm.2016.10.015.
45. CLÉ, Marion, SALINAS, Sara, LECOLLINET, Sylvie, BECK, Cécile, GUTIERREZ, Serafin, BALDET, Thierry, PERRE, Philippe Vande, FOULONGNE, Vincent et SIMONIN, Yannick. Le virus Usutu : la menace fantôme. *médecine/sciences*. 1 août 2018. Vol. 34, n° 8-9, pp. 709-716. DOI 10.1051/medsci/20183408018.

46. HESSE, Marc. *Diagnostic différentiel des encéphalites équine en France: approche clinique et expérimentale, conséquences réglementaires*. . Thèse d'exercice. Lyon ; 1971-....., France : Université Claude Bernard, 2005.
47. RESPE. APPEL A VIGILANCE – FIÈVRE DE WEST NILE - RESPE. *Respe - Réseau d'Epidémio-Surveillance en Pathologie Équine*. [en ligne]. 28 octobre 2022. [Consulté le 24 juin 2023]. Disponible à l'adresse: <https://respe.net/appele-a-vigilance-fievre-de-west-nile/>
48. DANIELS, HÉLÈNE. *Cours d'immunologie médicale, ENVT*.
49. GOTHE, Leonard M. R., GANZENBERG, Stefanie, ZIEGLER, Ute, OBIEGALA, Anna, LOHMANN, Katharina L., SIEG, Michael, VAHLENKAMP, Thomas W., GROSCHUP, Martin H., HÖRÜGEL, Uwe et PFEFFER, Martin. Horses as Sentinels for the Circulation of Flaviviruses in Eastern–Central Germany. *Viruses*. 30 avril 2023. Vol. 15, n° 5, pp. 1108. DOI 10.3390/v15051108.
50. LINKE, Sonja, ELLERBROK, Heinz, NIEDRIG, Matthias, NITSCHKE, Andreas et PAULI, Georg. Detection of West Nile virus lineages 1 and 2 by real-time PCR. *Journal of Virological Methods*. décembre 2007. Vol. 146, n° 1-2, pp. 355-358. DOI 10.1016/j.jviromet.2007.05.021.
51. Le test PCR comme outil de diagnostic (1/2) : Principes de base. [en ligne]. 22 juillet 2022. [Consulté le 15 juin 2024]. Disponible à l'adresse: https://www.3trois3.com/articles/le-test-pcr-comme-outil-de-diagnostic-1-2-principes-de-base_15823/
52. Techniques de laboratoire pour évaluer la réponse immunitaire des anticorps chez le porc. [en ligne]. 22 août 2018. [Consulté le 15 juin 2024]. Disponible à l'adresse: https://www.3trois3.com/articles/techniques-de-laboratoire-pour-evaluer-la-reponse-immunitaire_13126/
53. *Règlement d'exécution (UE) 2018/1882 de la Commission du 3 décembre 2018 sur l'application de certaines dispositions en matière de prévention et de lutte contre les maladies à des catégories de maladies répertoriées et établissant une liste des espèces et des groupes d'espèces qui présentent un risque considérable du point de vue de la propagation de ces maladies répertoriées (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE.)*. [en ligne]. 3 décembre 2018. [Consulté le 15 juin 2024]. Disponible à l'adresse: http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2018/1882/oj/fraLegislative Body: COM, SANTE
54. GARCÍA-BOCANEGRA, Ignacio, ARENAS-MONTES, Antonio, JAÉN-TÉLLEZ, Juan A., NAPP, Sebastián, FERNÁNDEZ-MORENTE, Manuel et ARENAS, Antonio. Use of sentinel serosurveillance of mules and donkeys in the monitoring of West Nile virus infection.

The Veterinary Journal. 1 novembre 2012. Vol. 194, n° 2, pp. 262-264.

DOI 10.1016/j.tvjl.2012.04.017.

55. Le cycle du moustique, ses lieux de prédilection et ses périodes d'apparition. [en ligne]. [Consulté le 20 juin 2025]. Disponible à l'adresse: <https://www.eid-rhonealpes.com/moustiques/la-vie-du-moustique-son-cycle-ses-lieux-de-predilection-et-ses-periodes-d-apparition>
56. VOGELS, C. B. F., GÖERTZ, G. P., PIJLMAN, G. P. et KOENRAADT, C. J. M. Vector competence of northern and southern European *Culex pipiens pipiens* mosquitoes for West Nile virus across a gradient of temperatures. *Medical and Veterinary Entomology*. décembre 2017. Vol. 31, n° 4, pp. 358-364. DOI 10.1111/mve.12251.
57. Unités de paysage | Gironde.FR. [en ligne]. [Consulté le 26 janvier 2025]. Disponible à l'adresse: <https://www.gironde.fr/environnement/atlas-des-paysages-de-la-gironde/unites-de-paysage>
58. Gironde - LAROUSSE. [en ligne]. [Consulté le 26 janvier 2025]. Disponible à l'adresse: https://www.larousse.fr/encyclopedie/departement/Gironde_33/121513
59. Tourisme et Vacances à Bordeaux et en Gironde- Visiter Bordeaux & Gironde. [en ligne]. [Consulté le 26 janvier 2025]. Disponible à l'adresse: <https://www.guide-bordeaux-gironde.com/fr/tourisme/decouvrir/bordeaux-et-la-gironde.html>
60. *DIR-effectif-equides-par-departement-2021.pdf*. [en ligne]. [Consulté le 26 janvier 2025]. Disponible à l'adresse: <https://www.ifce.fr/wp-content/uploads/2022/12/DIR-effectif-equides-par-departement-2021.pdf>
61. *OESC-OERV3-Nouvelle-Aquitaine.pdf*. [en ligne]. [Consulté le 26 janvier 2025]. Disponible à l'adresse: <https://www.ifce.fr/wp-content/uploads/2017/06/OESC-OERV3-Nouvelle-Aquitaine.pdf>
62. Protéger, restaurer, gérer. *Agence Régionale de la Biodiversité Nouvelle-Aquitaine*. [en ligne]. 30 septembre 2020. [Consulté le 26 janvier 2025]. Disponible à l'adresse: <https://www.biodiversite-nouvelle-aquitaine.fr/connaitre/protection-et-reconquete/proteger-gerer/>
63. L'estuaire de la Gironde : un milieu naturel - Importance de l'avifaune. [en ligne]. [Consulté le 26 janvier 2025]. Disponible à l'adresse: <https://estuairegironde.net/est/ceg-409.html>
64. BARUSSAUD, Emilien. Oiseaux : les « couloirs » de migration existent-ils ? *B.E.T - Eviter l'impact*. [en ligne]. 18 décembre 2017. [Consulté le 20 juin 2025]. Disponible à l'adresse: <https://bet-barussaud.fr/oiseaux-les-couloirs-de-migration-existent-ils/>

65. NOÉMIE CHEVALIER. (PDF) Seroprevalence of West Nile, Usutu and Tick borne encephalitis viruses in equids from southwestern France in 2023. *ResearchGate*. [en ligne]. 10 octobre 2024. [Consulté le 26 janvier 2025].
66. LEBLOND A., BICOUT D., ET AL. West Nile Virus infection of horses in Camargue, France (2000-2003). In : *Emerging Infectious Diseases*. 2004.
67. DE HEUS, Phebe, KOLODZIEJEK, Jolanta, HUBÁLEK, Zdeněk, DIMMEL, Katharina, RACHER, Victoria, NOWOTNY, Norbert et CAVALLERI, Jessika-M. V. West Nile Virus and Tick-Borne Encephalitis Virus Are Endemic in Equids in Eastern Austria. *Viruses*. septembre 2021. Vol. 13, n° 9, pp. 1873. DOI 10.3390/v13091873.
68. FINDLAY, John W. A. et DILLARD, Robert F. Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays. *The AAPS Journal*. juin 2007. Vol. 9, n° 2, pp. E260-E267. DOI 10.1208/aapsj0902029.
69. ID Screen® Flavivirus Competition. *Innovative Diagnostics*. [en ligne]. [Consulté le 26 janvier 2025]. Disponible à l'adresse: <https://www.innovative-diagnostics.com/fr/produit/id-screen-west-nile-competition-multi-species-fr/>
70. Peroxydase de raifort. *Wikipédia*. [en ligne]. 2022. [Consulté le 26 janvier 2025]. Disponible à l'adresse: https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Peroxydase_de_raifort&oldid=191394590 Page Version ID: 191394590
71. BECK, Cécile, DESPRÈS, Philippe, PAULOUS, Sylvie, VANHOMWEGEN, Jessica, LOWENSKI, Steeve, NOWOTNY, Norbert, DURAND, Benoit, GARNIER, Annabelle, BLAISE-BOISSEAU, Sandra, GUITTON, Edouard, YAMANAKA, Takashi, ZIENTARA, Stéphan et LECOLLINET, Sylvie. A High-Performance Multiplex Immunoassay for Serodiagnosis of Flavivirus-Associated Neurological Diseases in Horses. *BioMed Research International*. 2015. Vol. 2015, pp. 678084. DOI 10.1155/2015/678084.
72. DELFAUD, AURÉLIEN. *Infection par le virus West Nile chez les équidés en Camargue : bilan d'un suivi sérologique (2000-2003)*. [en ligne]. Ecole Nationale vétérinaire de Lyon, 2004. [Consulté le 26 janvier 2025]. Disponible à l'adresse: <https://www.google.com/search?q=Th%C3%A8se+Delfaud&oq=Th%C3%A8se+Delfaud&aqs=chrome..69i57j33i160.655j0j7&sourceid=chrome&ie=UTF-8>
73. GUERRERO-CARVAJAL, Fátima, BRAVO-BARRIGA, Daniel, MARTÍN-CUERVO, María, AGUILERA-SEPÚLVEDA, Pilar, FERRAGUTI, Martina, JIMÉNEZ-CLAVERO, Miguel Ángel, LLORENTE, Francisco, ALONSO, Juan Manuel et FRONTERA, Eva. Serological evidence of co-circulation of West Nile and Usutu viruses in

equids from western Spain. *Transboundary and Emerging Diseases*. mai 2021. Vol. 68, n° 3, pp. 1432-1444. DOI 10.1111/tbed.13810.

74. NAPP, Sebastian, LLORENTE, Francisco, BECK, Cécile, JOSE-CUNILLERAS, Eduard, SOLER, Mercè, PAILLER-GARCÍA, Lola, AMARAL, Rayane, AGUILERA-SEPÚLVEDA, Pilar, PIFARRÉ, Maria, MOLINA-LÓPEZ, Rafael, OBÓN, Elena, NICOLÁS, Olga, LECOLLINET, Sylvie, JIMÉNEZ-CLAVERO, Miguel Ángel et BUSQUETS, Núria. Widespread Circulation of Flaviviruses in Horses and Birds in Northeastern Spain (Catalonia) between 2010 and 2019. *Viruses*. décembre 2021. Vol. 13, n° 12, pp. 2404. DOI 10.3390/v13122404.

75. SELIM, Abdelfattah, MEGAHED, Ameer, KANDEEL, Sahar, ALOUFFI, Abdulaziz et ALMUTAIRI, Mashal M. West Nile virus seroprevalence and associated risk factors among horses in Egypt. *Scientific Reports*. 22 octobre 2021. Vol. 11, n° 1, pp. 20932. DOI 10.1038/s41598-021-00449-6.

76. BARBIĆ, Ljubo, LISTEŠ, Eddy, KATIĆ, Sanda, STEVANOVIĆ, Vladimir, MADIĆ, Josip, STAREŠINA, Vilim, LABROVIĆ, Ankica, DI GENNARO, Annapia et SAVINI, Giovanni. Spreading of West Nile virus infection in Croatia. *Veterinary Microbiology*. 12 octobre 2012. Vol. 159, n° 3, pp. 504-508. DOI 10.1016/j.vetmic.2012.04.038.

77. LUPULOVIC, Diana, MARTÍN-ACEBES, Miguel A., LAZIC, Sava, ALONSO-PADILLA, Julio, BLÁZQUEZ, Ana-Belén, ESCRIBANO-ROMERO, Estela, PETROVIC, Tamas et SAIZ, Juan-Carlos. First serological evidence of West Nile virus activity in horses in Serbia. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*. septembre 2011. Vol. 11, n° 9, pp. 1303-1305. DOI 10.1089/vbz.2010.0249.

78. ZIEGLER, Ute, SKRYPNYK, Artem, KELLER, Markus, STAUBACH, Christoph, BEZYMENNYI, Maksym, DAMIANI, Armando M., OSTERRIEDER, Nikolaus et GROSCHUP, Martin H. West Nile Virus Antibody Prevalence in Horses in Ukraine. *Viruses*. 4 octobre 2013. Vol. 5, n° 10, pp. 2469-2482. DOI 10.3390/v5102469.

79. BERXHOLI, K., ZIEGLER, U., REXHEPI, A., SCHMIDT, K., MERTENS, M., KORRO, K., CUKO, A., ANGENVOORT, J. et GROSCHUP, M. H. Indigenous West Nile virus infections in horses in Albania. *Transboundary and Emerging Diseases*. novembre 2013. Vol. 60 Suppl 2, pp. 45-50. DOI 10.1111/tbed.12141.

80. MAQUART, Marianne, DAHMANI, Mustapha, MARIÉ, Jean-Lou, GRAVIER, Patrick, LEPARC-GOFFART, Isabelle et DAVOUST, Bernard. First Serological Evidence of West Nile Virus in Horses and Dogs from Corsica Island, France. *Vector Borne and Zoonotic*

Diseases (Larchmont, N.Y.). avril 2017. Vol. 17, n° 4, pp. 275-277.

DOI 10.1089/vbz.2016.2024.

81. BAŻANÓW, Barbara, JANSEN VAN VUREN, Petrus, SZYMAŃSKI, Piotr, STYGAR, Dominika, FRĄCKA, Agnieszka, TWARDOŃ, Jan, KOZDROWSKI, Roland et PAWĘSKA, Janusz T. A Survey on West Nile and Usutu Viruses in Horses and Birds in Poland. *Viruses*. 17 février 2018. Vol. 10, n° 2, pp. 87. DOI 10.3390/v10020087.

82. REXHEPI, Agim, SHERIFI, Kurtesh, BERXHOLI, Kristaq, XHEKAJ, Betim, MUJA-BAJRAKTARI, Nesade, ÖZKUL, Aykut, VON POSSEL, Ronald et EMMERICH, Petra. First Serological Evidence of West Nile Virus Among Equines and Birds in Kosovo, 2018-2019. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*. février 2021. Vol. 21, n° 2, pp. 116-120. DOI 10.1089/vbz.2020.2673.

83. DE HEUS, Phebe, KOLODZIEJEK, Jolanta, HUBÁLEK, Zdeněk, DIMMEL, Katharina, RACHER, Victoria, NOWOTNY, Norbert et CAVALLERI, Jessika-M. V. West Nile Virus and Tick-Borne Encephalitis Virus Are Endemic in Equids in Eastern Austria. *Viruses*. 19 septembre 2021. Vol. 13, n° 9, pp. 1873. DOI 10.3390/v13091873.

84. CONSTANT, Oriane, GIL, Patricia, BARTHELEMY, Jonathan, BOLLORÉ, Karine, FOULONGNE, Vincent, DESMETZ, Caroline, LEBLOND, Agnès, DESJARDINS, Isabelle, PRADIER, Sophie, JOULIÉ, Aurélien, SANDOZ, Alain, AMARAL, Rayane, BOISSEAU, Michel, RAKOTOARIVONY, Ignace, BALDET, Thierry, MARIE, Albane, FRANCES, Benoît, REBOUL SALZE, Florence, TINTO, Bachirou, VAN DE PERRE, Philippe, SALINAS, Sara, BECK, Cécile, LECOLLINET, Sylvie, GUTIERREZ, Serafin et SIMONIN, Yannick. One Health surveillance of West Nile and Usutu viruses: a repeated cross-sectional study exploring seroprevalence and endemicity in Southern France, 2016 to 2020.

Eurosurveillance. [en ligne]. 23 juin 2022. Vol. 27, n° 25. [Consulté le 25 mai 2023].

DOI 10.2807/1560-7917.ES.2022.27.25.2200068.

85. AHARONSON-RAZ, Karin, LICHTER-PELED, Anat, TAL, Shlomit, GELMAN, Boris, COHEN, Daniel, KLEMENT, Eyal et STEINMAN, Amir. Spatial and Temporal Distribution of West Nile Virus in Horses in Israel (1997–2013) - from Endemic to Epidemics. *PLOS ONE*. 17 novembre 2014. Vol. 9, n° 11, pp. e113149.

DOI 10.1371/journal.pone.0113149.

86. EPP, Tasha, WALDNER, Cheryl, WEST, Keith et TOWNSEND, Hugh. Factors associated with West Nile virus disease fatalities in horses. *The Canadian Veterinary Journal*. novembre 2007. Vol. 48, n° 11, pp. 1137-1145.

87. NOUVELLE-AQUITAINE, DREAL. Migration des oiseaux. *DREAL Nouvelle-Aquitaine*. [en ligne]. 4 novembre 2016. [Consulté le 26 janvier 2025]. Disponible à l'adresse: <https://www.nouvelle-aquitaine.developpement-durable.gouv.fr/migration-des-oiseaux-a1725.html> Last Modified: 2016-11-04
88. MORITZ, Max A., BATLLORI, Enric et BOLKER, Benjamin M. The role of fire in terrestrial vertebrate richness patterns. *Ecology Letters*. avril 2023. Vol. 26, n° 4, pp. 563-574. DOI 10.1111/ele.14177.
89. PAZ, Shlomit et SEMENZA, Jan C. Environmental Drivers of West Nile Fever Epidemiology in Europe and Western Asia—A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. août 2013. Vol. 10, n° 8, pp. 3543-3562. DOI 10.3390/ijerph10083543.
90. RESSEGUIER, Pierre. Contribution à l'étude du repas sanguin de culex pipiens pipiens. .
91. MUÑOZ, Joaquín, RUIZ, Santiago, SORIGUER, Ramón, ALCAIDE, Miguel, VIANA, Duarte S., ROIZ, David, VÁZQUEZ, Ana et FIGUEROLA, Jordi. Feeding Patterns of Potential West Nile Virus Vectors in South-West Spain. *PLoS ONE*. 22 juin 2012. Vol. 7, n° 6, pp. e39549. DOI 10.1371/journal.pone.0039549.
92. REISEN, William K., FANG, Ying, LOTHROP, Hugh D., MARTINEZ, Vincent M., WILSON, Jennifer, OCONNOR, Paul, CARNEY, Ryan, CAHOON-YOUNG, Barbara, SHAFII, Marzieh et BRAULT, Aaron C. Overwintering of West Nile virus in Southern California. *Journal of Medical Entomology*. mars 2006. Vol. 43, n° 2, pp. 344-355. DOI 10.1603/0022-2585(2006)043[0344:oownvi]2.0.co;2.
93. RIZZOLI, Annapaola, BOLZONI, Luca, CHADWICK, Elizabeth A., CAPELLI, Gioia, MONTARSI, Fabrizio, GRISENTI, Michela, DE LA PUENTE, Josue Martínez, MUÑOZ, Joaquin, FIGUEROLA, Jordi, SORIGUER, Ramon, ANFORA, Gianfranco, DI LUCA, Marco et ROSÀ, Roberto. Understanding West Nile virus ecology in Europe: Culex pipiens host feeding preference in a hotspot of virus emergence. *Parasites & Vectors*. 9 avril 2015. Vol. 8, n° 1, pp. 213. DOI 10.1186/s13071-015-0831-4.
94. STEJSKALOVA, K., CVANOVA, M., OPPELT, J., JANOVA, E., HORECKY, C., HORECKA, E., KNOLL, A., LEBLOND, A. et HORIN, P. Genetic susceptibility to West Nile virus infection in Camargue horses. *Research in Veterinary Science*. juin 2019. Vol. 124, pp. 284-292. DOI 10.1016/j.rvsc.2019.04.004.

95. BRAULT, Aaron C. Changing patterns of West Nile virus transmission: altered vector competence and host susceptibility. *Veterinary Research*. 2009. Vol. 40, n° 2, pp. 43. DOI 10.1051/vetres/2009026.
96. COFFEY, Lark L, FORRESTER, Naomi, TSETSARKIN, Konstantin, VASILAKIS, Nikos et WEAVER, Scott C. Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. *Future microbiology*. février 2013. Vol. 8, n° 2, pp. 155-176. DOI 10.2217/fmb.12.139.
97. FOLLY, Arran J., WALLER, Elisabeth S. L., MCCRACKEN, Fiona, MCELHINNEY, Lorraine M., ROBERTS, Helen et JOHNSON, Nicholas. Equine seroprevalence of West Nile virus antibodies in the UK in 2019. *Parasites & Vectors*. 26 novembre 2020. Vol. 13, pp. 596. DOI 10.1186/s13071-020-04481-9.
98. PASTEUR, research pasteur fr-Institut. Exposure of cattle to tick-borne encephalitis virus in the historical endemic zone in north-eastern France. *Research*. [en ligne]. [Consulté le 25 juin 2025]. Disponible à l'adresse: <https://research.pasteur.fr/en/publication/exposure-of-cattle-to-tick-borne-encephalitis-virus-in-the-historical-endemic-zone-in-north-eastern-france/>
99. SHIRAI, Yoshikazu, FUNADA, Hisashi, SEKI, Taisuke, MOROHASHI, Masaaki et KAMIMURA, Kiyoshi. Landing preference of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) on human skin among ABO blood groups, secretors or nonsecretors, and ABH antigens. *Journal of Medical Entomology*. juillet 2004. Vol. 41, n° 4, pp. 796-799. DOI 10.1603/0022-2585-41.4.796.
100. GONZALEZ, Gaëlle. Transmission des virus West Nile (WNV) et Usutu (USUV) en France. *UMR Virologie, Laboratoire de Santé Animale, ANSES, Maisons-Alfort*. 25 avril 2024.
101. ESCRIBANO-ROMERO, Estela, JIMÉNEZ DE OYA, Nereida, CAMACHO, María-Cruz, BLÁZQUEZ, Ana-Belén, MARTÍN-ACEBES, Miguel A., RISALDE, Maria A., MURIEL, Laura, SAIZ, Juan-Carlos et HÖFLE, Ursula. Previous Usutu Virus Exposure Partially Protects Magpies (*Pica pica*) against West Nile Virus Disease But Does Not Prevent Horizontal Transmission. *Viruses*. 20 juillet 2021. Vol. 13, n° 7, pp. 1409. DOI 10.3390/v13071409.
102. (PDF) Molecular Xenomonitoring (MX) allows real-time surveillance of West Nile and Usutu virus in mosquito populations. *ResearchGate*. [en ligne]. 9 décembre 2024. [Consulté le 26 janvier 2025].

103. HCSP. *Sécurisation des produits issus du corps humain dans le cadre de la circulation active du virus West-Nile en Gironde* [en ligne]. Paris : Haut Conseil de la Santé Publique, 2023. [Consulté le 25 juin 2025]. Disponible à l'adresse: <https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=1328>
104. RESPE. Plusieurs cas de fièvre de West Nile confirmés par le RESPE - RESPE. *Respe - Réseau d'Epidémio-Surveillance en Pathologie Équine*. [en ligne]. 10 septembre 2024. [Consulté le 26 janvier 2025]. Disponible à l'adresse: <https://respe.net/plusieurs-cas-de-fievre-de-west-nile-confirmes-par-le-respe/>
105. CÉCILE BECK. Flavivirus d'intérêt chez le cheval : outils de diagnostic innovants et traitements antiviraux potentiels. [en ligne]. 2016. Disponible à l'adresse: [file:///Users/margaux/Downloads/17187_1.0.0%20\(3\).pdf](file:///Users/margaux/Downloads/17187_1.0.0%20(3).pdf)
106. *Avis du COVARs du 24 juin 2024 : west-nile et usutu*. [en ligne]. [Consulté le 7 février 2025]. Disponible à l'adresse: <https://www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/sites/default/files/2024-06/avis-du-covars-du-24-juin-2024---west-nile-et-usutu-33576.pdf>
107. BEN-MOSTAFA, Kholoud Khalid, SAVINI, Giovanni, DI GENNARO, Annapia, TEODORI, Liana, LEONE, Alessandra, MONACO, Federica, ALAOQIB, Mohammed Masoud A., RAYES, Abdunnabi A., DAYHUM, Abdunaser et ELDAGHAYES, Ibrahim. Evidence of West Nile Virus Circulation in Horses and Dogs in Libya. *Pathogens (Basel, Switzerland)*. 31 décembre 2023. Vol. 13, n° 1, pp. 41. DOI 10.3390/pathogens13010041.
108. WILLIAMS, Richard A. J., CRIOLLO VALENCIA, Hillary A., LÓPEZ MÁRQUEZ, Irene, GONZÁLEZ GONZÁLEZ, Fernando, LLORENTE, Francisco, JIMÉNEZ-CLAVERO, Miguel Ángel, BUSQUETS, Núria, MATEO BARRIENTOS, Marta, ORTIZ-DÍEZ, Gustavo et AYLLÓN SANTIAGO, Tania. West Nile Virus Seroprevalence in Wild Birds and Equines in Madrid Province, Spain. *Veterinary Sciences*. 7 juin 2024. Vol. 11, n° 6, pp. 259. DOI 10.3390/vetsci11060259.
109. BRAKS, Marieta A. H., DUIJSTER, Janneke W. et STROO, C. Arjan J. [West Nile virus unexpectedly in the Netherlands]. *Nederlands Tijdschrift Voor Geneeskunde*. 28 mars 2022. Vol. 166, pp. D6278.
110. STRENG, Kiki, HAKZE-VAN DER HONING, Renate W., GRAHAM, Heather, VAN OORT, Sophie, DE BEST, Pauline A., ABOURASHED, Ayat et VAN DER POEL, Wim H. M. Orthoflavivirus surveillance in the Netherlands: Insights from a serosurvey in horses & dogs and a questionnaire among horse owners. *Zoonoses and Public Health*. décembre 2024. Vol. 71, n° 8, pp. 900-910. DOI 10.1111/zph.13171.

111. DE MARTINIS, Claudio, CARDILLO, Lorena, PESCE, Federica, VISCARDI, Maurizio, COZZOLINO, Loredana, PARADISO, Rubina, CAVALLO, Stefania, DE ASCENTIS, Matteo, GOFFREDO, Maria, MONACO, Federica, SAVINI, Giovanni, D'ORILIA, Francescantonio, PINTO, Renato et FUSCO, Giovanna. Reoccurrence of West Nile virus lineage 1 after 2-year decline: first equine outbreak in Campania region. *Frontiers in Veterinary Science*. 2023. Vol. 10, pp. 1314738. DOI 10.3389/fvets.2023.1314738.
112. LOCONSOLE, Daniela, CENTRONE, Francesca, SALLUSTIO, Anna, CASULLI, Daniele, COLELLA, Vito, MONGELLI, Onofrio, VENTURI, Giulietta, BELLA, Antonino, MARINO, Leonardo, MARTINELLI, Domenico et CHIRONNA, Maria. Abrupt Increase in Detection of Locally Acquired West-Nile-Virus-Lineage-2-Mediated Neuroinvasive Disease in a Previously Non-Endemic Area of Southern Italy (2023). *Viruses*. 28 décembre 2023. Vol. 16, n° 1, pp. 53. DOI 10.3390/v16010053.
113. FIACRE, Lise, NOUGAIREDE, Antoine, MIGNÉ, Camille, BAYET, Maëlle, COCHIN, Maxime, DUMAREST, Marine, HELLE, Teheipuaura, EXBRAYAT, Antoni, PAGÈS, Nonito, VITOUR, Damien, RICHARDSON, Jennifer P., FAILLOUX, Anna-Bella, VAZEILLE, Marie, ALBINA, Emmanuel, LECOLLINET, Sylvie et GONZALEZ, Gaëlle. Different viral genes modulate virulence in model mammal hosts and *Culex pipiens* vector competence in Mediterranean basin lineage 1 West Nile virus strains. *Frontiers in Microbiology*. 2023. Vol. 14, pp. 1324069. DOI 10.3389/fmicb.2023.1324069.
114. GARRIGÓS, Marta, GARRIDO, Mario, PANISSE, Guillermo, VEIGA, Jesús et MARTÍNEZ-DE LA PUENTE, Josué. Interactions between West Nile Virus and the Microbiota of *Culex pipiens* Vectors: A Literature Review. *Pathogens (Basel, Switzerland)*. 27 octobre 2023. Vol. 12, n° 11, pp. 1287. DOI 10.3390/pathogens12111287.
115. STRENG, Kiki, ATAMA, Nnomzie, CHANDLER, Felicity, BLOM, Rody, VAN DER JEUGD, Henk, SCHRAMA, Maarten, KOOPMANS, Marion P. G., VAN DER POEL, Wim H. M. et SIKKEMA, Reina S. Sentinel chicken surveillance reveals previously undetected circulation of West Nile virus in the Netherlands. *Emerging Microbes & Infections*. décembre 2024. Vol. 13, n° 1, pp. 2406278. DOI 10.1080/22221751.2024.2406278.
116. GODARZI, Bijan, CHANDLER, Felicity, VAN DER LINDEN, Anne, SIKKEMA, Reina S., DE BRUIN, Erwin, VELDHUIZEN, Edwin, VAN AMERONGEN, Aart et GRÖNE, Andrea. A species-independent lateral flow microarray immunoassay to detect WNV and USUV NS1-specific antibodies in serum. *One Health (Amsterdam, Netherlands)*. juin 2024. Vol. 18, pp. 100668. DOI 10.1016/j.onehlt.2023.100668.

117. TOLNAI, C. H. Comparison of the long-term humoral immune response against West Nile virus in clinically and inapparently infected horses. *ECEIM Congress*. University of Veterinary Medicine Budapest, Budapest, Hungary. 15 novembre 2024.
118. PIERRE-THOMAS. Fièvre de West Nile - Communiqué du 19/09/2024 - RESPE. *Respe - Réseau d'Epidémiologie-Surveillance en Pathologie Équine*. [en ligne]. 19 septembre 2024. [Consulté le 29 avril 2025]. Disponible à l'adresse: <https://respe.net/fievre-de-west-nile-communique-du-19-09-2024/>
119. 17th European College of Equine Internal Medicine (ECEIM) Congress Copenhagen, Denmark 14-16 November 2024. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2025. Vol. 39, n° 1, pp. e17292. DOI 10.1111/jvim.17292.
120. Special Feature: West Nile Virus in U.S. Horses. *The Horse*. [en ligne]. [Consulté le 25 juin 2025]. Disponible à l'adresse: <https://thehorse.com/features/west-nile-virus-u-s-horses/>
121. CENDEJAS, Parker M. et GOODMAN, Alan G. Vaccination and Control Methods of West Nile Virus Infection in Equids and Humans. *Vaccines*. 1 mai 2024. Vol. 12, n° 5, pp. 485. DOI 10.3390/vaccines12050485.
122. COCHET, Marielle, PIUMI, François, GORNA, Kamila, BERRY, Noémie, GONZALEZ, Gaëlle, DANCKAERT, Anne, AULNER, Nathalie, BLANCHET, Odile, ZIENTARA, Stéphan, DONADEU, Francesc Xavier, MUNIER-LEHMANN, Hélène, RICHARDSON, Jennifer, BENCHOUA, Alexandra et COULPIER, Muriel. An equine iPSC-based phenotypic screening platform identifies pro- and anti-viral molecules against West Nile virus. *Veterinary Research*. 16 mars 2024. Vol. 55, n° 1, pp. 32. DOI 10.1186/s13567-024-01290-1.
123. NDIONE, Marie Henriette Dior, DIAGNE, Moussa Moïse, MENCATTELLI, Giulia, DIALLO, Amadou, NDIAYE, El Hadji, DI DOMENICO, Marco, DIALLO, Diawo, KANE, Mouhamed, CURINI, Valentina, TOP, Ndeye Marieme, MARCACCI, Maurilia, SANKHE, Safiétou, ANCORA, Massimo, SECONDINI, Barbara, DI LOLLO, Valeria, TEODORI, Liana, LEONE, Alessandra, PUGLIA, Ilaria, GAYE, Alioune, SALL, Amadou Alpha, LOUCOUBAR, Cheikh, ROSÀ, Roberto, DIALLO, Mawlouth, MONACO, Federica, FAYE, Ousmane, CAMMÀ, Cesare, RIZZOLI, Annapaola, SAVINI, Giovanni et FAYE, Oumar. An amplicon-based sequencing approach for Usutu virus characterization. *Virology Journal*. 23 juillet 2024. Vol. 21, n° 1, pp. 163. DOI 10.1186/s12985-024-02426-7.
124. TOPP, Anna-Katharina, SPRINGER, Andrea, MISCHKE, Reinhard, RIEDER, Johanna, FEIGE, Karsten, GANTER, Martin, NAGEL-KOHL, Uschi, NORDHOFF, Marcel,

- BOELKE, Matthias, BECKER, Stefanie, PACHNICKE, Stefan, SCHUNACK, Bettina, DOBLER, Gerhard et STRUBE, Christina. Seroprevalence of tick-borne encephalitis virus in wild and domestic animals in northern Germany. *Ticks and Tick-Borne Diseases*. novembre 2023. Vol. 14, n° 6, pp. 102220. DOI 10.1016/j.ttbdis.2023.102220.
125. VILIBIC-CAVLEK, Tatjana, KRČMAR, Stjepan, BOGDANIC, Maja, TOMLJENOVIC, Morana, BARBIC, Ljubo, RONCEVIC, Dobrica, SABADI, Dario, VUCELJA, Marko, SANTINI, Marija, HUNJAK, Blazenka, STEVANOVIC, Vladimir, BOLJFETIC, Marko, BJEDOV, Linda, MASOVIC, Viktor, POTOČNIK-HUNJADI, Tanja, LAKOSELJAC, Danijela, AL-MUFLEH, Mahmoud et SAVIC, Vladimir. An Overview of Tick-Borne Encephalitis Epidemiology in Endemic Regions of Continental Croatia, 2017–2023. *Microorganisms*. 13 février 2024. Vol. 12, n° 2, pp. 386. DOI 10.3390/microorganisms12020386.
126. KÄLIN, Dana, BECSEK, Angela, STÜRMER, Helen, BACHOFEN, Claudia, SIEGRIST, Denise, JONSDOTTIR, Hulda R. et SCHOSTER, Angelika. Immune Response after Vaccination against Tick-Borne Encephalitis Virus (TBEV) in Horses. *Vaccines*. 19 septembre 2024. Vol. 12, n° 9, pp. 1074. DOI 10.3390/vaccines12091074.
127. Bulletin hebdomadaire de veille sanitaire internationale du 10/12/2024. [en ligne]. [Consulté le 25 juin 2025]. Disponible à l'adresse: <https://www.plateforme-esa.fr/fr/bulletin-hebdomadaire-de-veille-sanitaire-internationale-du-10-12-2024>
128. Monthly updates: 2024 West Nile virus transmission season. [en ligne]. [Consulté le 29 avril 2025]. Disponible à l'adresse: <https://www.ecdc.europa.eu/en/infectious-disease-topics/west-nile-virus-infection/surveillance-and-disease-data/monthly-updates>
129. Cas groupés d'infections par le virus de l'encéphalite à tiques (TBE) | SRLF. [en ligne]. [Consulté le 29 avril 2025]. Disponible à l'adresse: <https://www.srlf.org/article/cas-groupes-dinfections-virus-lencephalite-tiques-tbe>
130. Virus de l'encéphalite équine de l'Est. *Wikipédia*. [en ligne]. 2024. [Consulté le 27 janvier 2025]. Disponible à l'adresse: https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Virus_de_l%27enc%C3%A9phalite_%C3%A9quine_de_l%27Est&oldid=217918446 Page Version ID: 217918446
131. GONZALEZ, Gaëlle, BOURNEZ, Laure, MORAES, Rayane Amaral, MARINE, Dumarest, GALON, Clémence, VORIMORE, Fabien, COCHIN, Maxime, NOUGAIREDE, Antoine, HENNECHART-COLLETTE, Catherine, PERELLE, Sylvie, LEPARC-GOFFART, Isabelle, DURAND, Guillaume André, GRARD, Gilda, BÉNET, Thomas, DANJOU, Nathalie, BLANCHIN, Martine, LACOUR, Sandrine A., FRANCK, Boué, CHENUT,

Guillaume, MAINGUET, Catherine, SIMON, Catherine, BRÉMONT, Laurence, ZIENTARA, Stephan, MOUTAILLER, Sara, MARTIN-LATIL, Sandra, DHEILLY, Nolwenn M., BECK, Cécile et LECOLLINET, Sylvie. A One-Health Approach to Investigating an Outbreak of Alimentary Tick-Borne Encephalitis in a Non-endemic Area in France (Ain, Eastern France): A Longitudinal Serological Study in Livestock, Detection in Ticks, and the First Tick-Borne Encephalitis Virus Isolation and Molecular Characterisation. *Frontiers in Microbiology*. 11 avril 2022. Vol. 13, pp. 863725.

DOI 10.3389/fmicb.2022.863725.

132. Tick-borne encephalitis (TBE) in 2024:A preliminary assessment - TBE Book. [en ligne]. [Consulté le 25 juin 2025]. Disponible à l'adresse: <https://tbenews.com/tbe/tick-borne-encephalitis-tbe-in-2024-a-preliminary-assessment/>

133. QUEIRÓS, João, BARROS, Sílvia C., SÁNCHEZ-CANO, Alberto, HENRIQUES, Ana Margarida, FAGULHA, Teresa, SANTOS, Fábio Abade dos, DUARTE, Margarida D., FONTOURA-GONÇALVES, Catarina, GONÇALVES, David, RODRIGUES, Marisa, CABRERA, Teresa Cardona, MERA, Isabel G. Fernández de, GORTAZAR, Christian, HÖFLE, Ursula et ALVES, Paulo Célio. Bagaza Virus in Wild Birds, Portugal, 2021 - Volume 28, Number 7—July 2022 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. [en ligne]. [Consulté le 26 janvier 2025]. DOI 10.3201/eid2807.212408.

134. DOS SANTOS, Fábio A. Abade, BARROS, Sílvia C., FAGULHA, Teresa, RAMOS, Fernanda, HENRIQUES, Ana M., DUARTE, Ana, MAGALHÃES, André, LUÍS, Tiago et DUARTE, Margarida D. First detection of Bagaza virus in Common magpies (*Pica pica*), Portugal 2023. *Scientific Reports*. 21 août 2024. Vol. 14, n° 1, pp. 19452.

DOI 10.1038/s41598-024-70011-7.

135. GUGGEMOS, Heiko D., FENDT, Matthias, HIEKE, Christian, HEYDE, Verena, MFUNE, John K. E., BORGEMEISTER, Christian et JUNGLEN, Sandra. Simultaneous circulation of two West Nile virus lineage 2 clades and Bagaza virus in the Zambezi region, Namibia. *PLoS neglected tropical diseases*. avril 2021. Vol. 15, n° 4, pp. e0009311.

DOI 10.1371/journal.pntd.0009311.

136. VITOUR, Damien, ZIENTARA, Stéphan, FABLET, Aurore, BRÉARD, Emmanuel et SAILLEAU, Corinne. [African horse sickness: an ancient disease for a current threat].

Virologie (Montrouge, France). 1 septembre 2022. Vol. 26, n° 5, pp. 375-386.

DOI 10.1684/vir.2022.0973.

137. DENNIS, Susan J., MEYERS, Ann E., HITZEROTH, Inga I. et RYBICKI, Edward P. African Horse Sickness: A Review of Current Understanding and Vaccine Development. *Viruses*. septembre 2019. Vol. 11, n° 9, pp. 844. DOI 10.3390/v11090844.
138. ARMSTRONG, Philip M. et ANDREADIS, Theodore G. Eastern Equine Encephalitis Virus — Old Enemy, New Threat. *New England Journal of Medicine*. 2 mai 2013. Vol. 368, n° 18, pp. 1670-1673. DOI 10.1056/NEJMp1213696.
139. GIL, Laura H. V. G., MAGALHAES, Tereza, SANTOS, Beatriz S. A. S., OLIVEIRA, Livia V., OLIVEIRA-FILHO, Edmilson F., CUNHA, João L. R., FRAIHA, Ana L. S., ROCHA, Brenda M. M., LONGO, Barbara C., ECCO, Roselene, FARIA, Guilherme C., FURTINI, Ronaldo, DRUMOND, Safira R. M., MARANHÃO, Renata P. A., LOBATO, Zélia I. P., GUEDES, Maria Isabel M. C., TEIXEIRA, Raffaella B. C. et COSTA, Erica A. Active Circulation of Madariaga Virus, a Member of the Eastern Equine Encephalitis Virus Complex, in Northeast Brazil. *Pathogens*. 3 août 2021. Vol. 10, n° 8, pp. 983. DOI 10.3390/pathogens10080983.
140. CDC. Clinical Features, Diagnosis, and Treatment of Western Equine Encephalitis. *Western Equine Encephalitis Virus*. [en ligne]. 6 juin 2024. [Consulté le 25 juin 2025]. Disponible à l'adresse: <https://www.cdc.gov/wee/hcp/clinical-diagnosis-treatment/index.html>
141. CROSBY, Brianna et CRESPO, Maria E. Venezuelan Equine Encephalitis. In : *StatPearls*. [en ligne]. Treasure Island (FL) : StatPearls Publishing, 2025. [Consulté le 27 janvier 2025]. Disponible à l'adresse: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559332/NBK559332>
142. Liste des dernières Alertes de maladie du cheval du RESPE. *Respe - Réseau d'Epidémio-Surveillance en Pathologie Équine*. [en ligne]. [Consulté le 27 janvier 2025]. Disponible à l'adresse: <https://respe.net/alertes/>
143. Encéphalites équinnes exotiques. *Respe - Réseau d'Epidémio-Surveillance en Pathologie Équine*. [en ligne]. [Consulté le 27 janvier 2025]. Disponible à l'adresse: <https://respe.net/maladie-equine/maladies-reglementees/encephalites-equines-exotiques/>
144. OCCITANIE, DRAAF. 01 - La nouvelle catégorisation des maladies animales et ses impacts. *DRAAF Occitanie*. [en ligne]. 9 mars 2021. [Consulté le 27 janvier 2025]. Disponible à l'adresse: <https://draaf.occitanie.agriculture.gouv.fr/01-la-nouvelle-categorisation-des-maladies-animales-et-ses-impacts-a5791.html> Last Modified: 2021-03-15
145. HANS, Aymeric, GUYADER, Emmanuel Le et PONÇON, Nicolas. L'anémie infectieuse des équidés en France et en Europe. .

146. WEISSENBÖCK, Herbert, BAGÓ, Zoltán, KOLODZIEJEK, Jolanta, HAGER, Barbara, PALMETZHOFER, Günter, DÜRRWALD, Ralf et NOWOTNY, Norbert. Infections of horses and shrews with Bornaviruses in Upper Austria: a novel endemic area of Borna disease. *Emerging Microbes & Infections*. juin 2017. Vol. 6, n° 6, pp. e52. DOI 10.1038/emi.2017.36.
147. RICHT, J. A., GRABNER, A. et HERZOG, S. Borna disease in horses. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*. décembre 2000. Vol. 16, n° 3, pp. 579-595, xi. DOI 10.1016/s0749-0739(17)30097-4.
148. NOBACH, Daniel, MÜLLER, Jana, TAPPE, Dennis et HERDEN, Christiane. Chapter Five - Update on immunopathology of bornavirus infections in humans and animals. In : CARR, John P. et ROOSSINCK, Marilyn J. (éd.), *Advances in Virus Research*. [en ligne]. Academic Press, 2020. pp. 159-222. Immunopathology. [Consulté le 27 janvier 2025].
149. AGUILERA-SEPÚLVEDA, Pilar, CANO-GÓMEZ, Cristina, VILLALBA, Rubén, BORGES, Vítor, AGÜERO, Montserrat, BRAVO-BARRIGA, Daniel, FRONTERA, Eva, JIMÉNEZ-CLAVERO, Miguel Ángel et FERNÁNDEZ-PINERO, Jovita. The key role of Spain in the traffic of West Nile virus lineage 1 strains between Europe and Africa. *Infectious Diseases (London, England)*. septembre 2024. Vol. 56, n° 9, pp. 743-758. DOI 10.1080/23744235.2024.2348633.

Annexes


Annexe 1 : Seroprevalence of West Nile, Usutu and tick-borne encephalitis viruses in equids from south-western France in 2023, N. Chevalier & al., 24 av. 2025

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Seroprevalence of West Nile, Usutu and tick-borne encephalitis viruses in equids from south-western France in 2023

Noémie Chevalier^{1†}, Camille V. Migné^{2*†}, Teheipuaura Mariteragi-Helle², Marine Dumarest², Margaux De Mas³, Manon Chevrier², Emilie Queré⁴, Christel Marcillaud-Pitel⁵, Coralie Lupo⁵, Clément Bigeard^{2,7}, Thierry Touzet⁶, Agnès Leblond⁷, Benoît Durand⁸, Marianne Depecker¹ and Gaëlle Gonzalez^{2*} 

Abstract

The circulation of West Nile virus (WNV), Usutu virus (USUV), and tick-borne encephalitis virus (TBEV) was investigated in south-western France during the first six months of 2023, following the emergence of WNV in equids in Gironde, a département in south-western France, in 2022. Blood samples were collected from 494 horses located in the Gironde département and divided into three zones: the Confluence zone, the Intermediate zone and the Arca-chon Basin. Samples were tested for WNV-, USUV- and TBEV-specific antibodies. An overall seroprevalence of 14% (95% CI [11–18%]) for orthoflavivirus antibodies was detected in Gironde. The highest seroprevalence rates for WNV and USUV were observed in the Confluence Zone (9%, 95% CI [6–13%] and 5%, 95% CI [3–8%], respectively), where the type of housing (animals kept in pasture only) and proximity to a special bird protection area were identified as risk factors for WNV seropositivity. This study presents the first seroprevalence investigation of WNV, USUV and TBEV infections in equids located on the Atlantic coast of France and demonstrates intense circulation of WNV in this region, as well as evidence of equine USUV-specific infection.

Keywords West Nile virus, Usutu virus, tick-borne encephalitis virus, seroprevalence, horse

Handling editor: Quirine ten Bosch.

[†]Noémie Chevalier and Camille V. Migné have contributed equally to this work.

*Correspondence:

Camille V. Migné
Camille.migne@anses.fr
Gaëlle Gonzalez
gaelle.gonzalez@anses.fr

¹ Clinique de Conques, Centre Hospitalier Vétérinaire Équin, 33420 Saint-Aubin-de-Branne, France

² UMR Virologie, Laboratoire de Santé Animale, ANSES, INRAE, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, 94700 Maisons-Alfort, France

³ École Nationale Vétérinaire de Toulouse, 31300 Toulouse, France

⁴ Écolecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort, 94700 Maisons-Alfort, France

⁵ RESPE (French Network for the Surveillance of Equine Diseases), 14280 Saint-Contest, France

⁶ Direction Départementale de La Protection des Populations de Gironde, 33520 Bruges, France

⁷ UMR EPiA (Épidémiologiepidémiologie des Maladies Animales et Zoonotiques), INRAE, Université de Lyon, VetAgro Sup, 69280 Marcy L'Etoile, France

⁸ EPiMIM, Laboratoire de Santé Animale, Anses, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, 94700 Maisons-Alfort, France



© The Author(s) 2025. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Introduction

West Nile virus (WNV) is a reemerging zoonotic mosquito-borne orthoflavivirus (*Flaviviridae* family) that represents a growing threat to human and animal health. It is one of the main viral agents causing encephalitis in humans and horses in Europe [1]. It was identified for the first time in Uganda in 1937 [2], and its circulation is now evident on all five continents [3]. WNV is maintained in an enzootic cycle involving ornithophilic mosquitoes as vectors (*Culex* spp.) and avian reservoirs and/or amplifying hosts. The virus can infect approximately one hundred mammalian host species, which are considered epidemiologically dead-end hosts that do not participate in virus spread [4]. Among them, humans and horses are known to develop symptoms following WNV infection. WNV infection is predominantly asymptomatic or can cause flu-like syndrome. In 1 to 10% of cases, neurological signs, the most common of which are ataxia, weakness and muscle fasciculations, are encountered. Some horses develop signs of encephalitis, leading to death or euthanasia [5–7]. In addition, human-to-human transmission of WNV during blood transfusions or organ transplants has been extensively documented and remains a major concern in the transfusion context [8, 9]. To reduce the risk of nonvector transmission, Europe introduced precautionary measures to control labile products, such as the exclusion of blood donors for 28 days after a visit to a high-risk area (European Directive 2004/33/EC) [9].

As WNV circulation is heterogeneous between Member States and is a compulsory notifiable disease for birds (since 2021), equines and humans (since 2009) to the European Commission [10], each country has implemented an appropriate surveillance and monitoring system to detect WNV cases in Equidae, avifauna and humans.

Over the last decade, Europe has faced significant changes in the distribution of WNV, as well as two other mosquito-borne orthoflaviviruses, Usutu virus (USUV) and tick-borne encephalitis virus (TBEV), most likely caused by global change and increasing global warming. The three viruses actively cocirculate in most European countries. Infections are mainly subclinical, and accurate estimations of infection incidence rates are difficult.

The surveillance of WNV infection relies heavily on neurological syndromic surveillance in humans and horses in most EU countries. Serosurveillance of equines is often employed to detect virus circulation in a territory and allows estimation of the intensity of circulation in that territory [3, 11–17]. The outdoor lifestyle of equines and their proximity to humans are good indicators of WNV circulation and human exposure.

In France, WNV was detected for the first time in the Camargue region in 1962. Between 2000 and 2021,

several WNV outbreaks of varying intensity were reported, all of which were located in the Mediterranean region and Corsica [18–21]. The 2022 transmission season was marked by the emergence of WNV in south-western France, which is located on the Atlantic coast. In October 2022, three horses of three distinct stables in Gironde, a département in this region (Figure 1), exhibited neurological signs, including ataxia, weakness, muscle fasciculations, and encephalitis. Acute WNV infection was confirmed by serological diagnostic methods (ELISA for IgM and IgG) carried out by the French National Reference Laboratory for WNV. USUV was detected for the first time in 2015 in blackbirds in the Rhône and Haut-Rhin départements [22]. A record circulation of the USUV was recorded in 2018, with earlier and more widespread detection than in previous years [23]. In 2022 and 2023, the USUV continued to circulate actively in France, with a human case diagnosed in Nouvelle Aquitaine region [24]. TBEV has been an increasing concern in France in recent years, with a slight increase in the number of cases reported since 2015 [25]. TBEV infection has been a notifiable disease in France since May 2021 [26].

To obtain an accurate assessment of orthoflavivirus circulation in Gironde, the first seroprevalence survey was conducted among equids located near stables where WNV cases in horses were newly reported in 2022 by investigating possible seroconversion to WNV, USUV and TBEV (Figure 1).

We aimed to provide valuable insights into the intensity of WNV circulation in 2022 in this newly emerging West Nile virus zone and the associated risk factors for infection. We also evaluated the occurrence of USUV and TBEV in horses in this area.

Materials and methods

Geographical zones

The survey was conducted in Gironde, south-western France, which is characterized by its contrasting landscape. The epidemiological parameters of the three defined zones were determined. The first zone, named Confluence, corresponds to the area where WNV-infected horses were reported in 2022 (Figure 1). The confluence lies at the junction of two rivers, the Garonne River and the Dordogne River, where large populations of mosquitoes can be expected. The second zone corresponds to the Arcachon Basin. The Arcachon Basin lies at the heart of the East Atlantic Flyway, one of the eight most important bird migration corridors on the planet. No cases of WNV infection were reported here [27]. These two zones offer a protected habitat for resident and migratory bird species (represented in green in Figure 1) that use wetlands as a stopover during their long

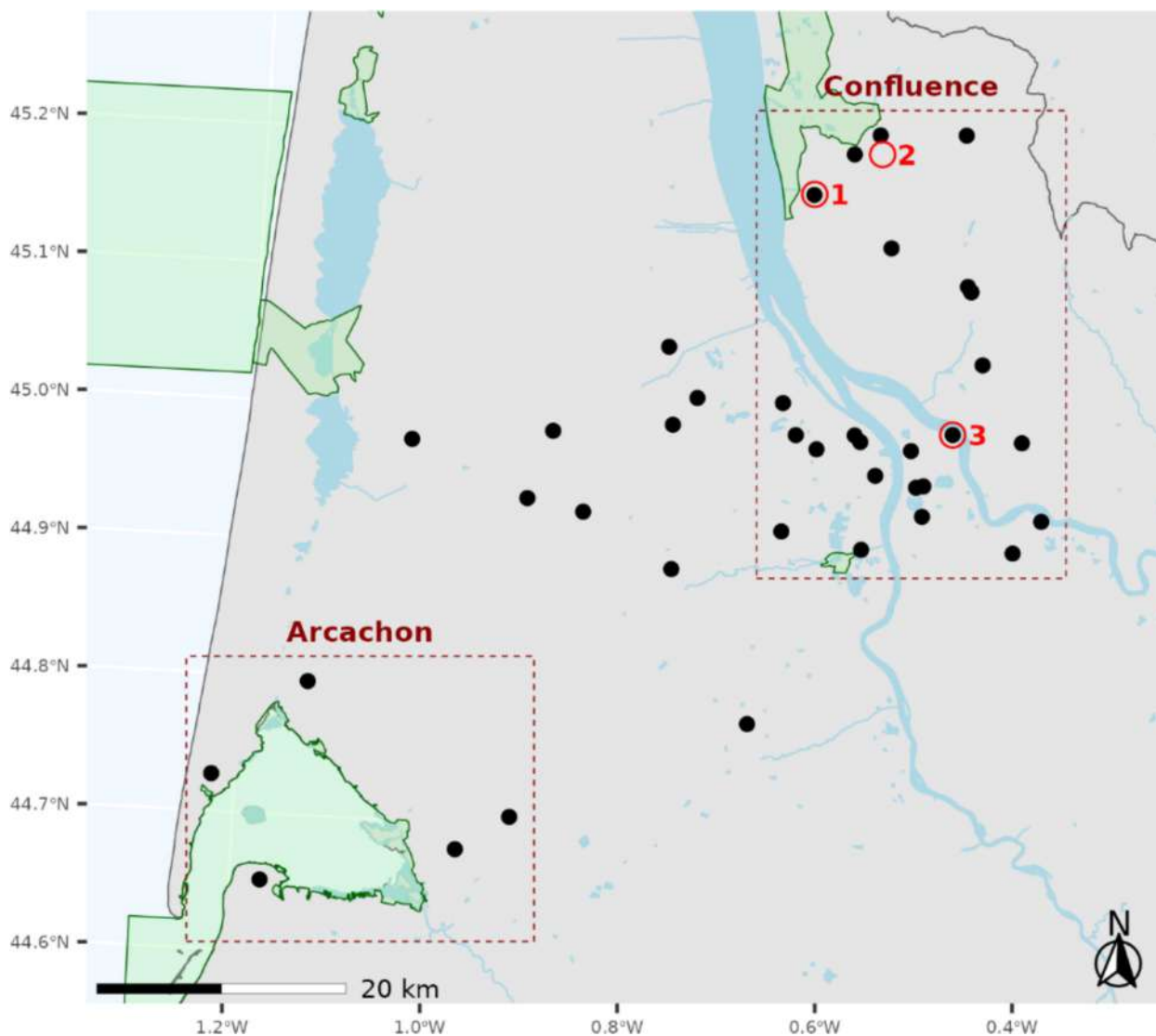


Figure 1 Map of the study area in south-western France, with black dots representing the stables where horses were sampled, grouped into two main zones: the Confluence and Arcachon zones. The red circles indicate the stables where clinical cases were reported in 2022, and the green polygons indicate the special protection areas for the protection of wild birds.

journeys. These avian tranquility zones encourage interactions between local mosquitoes and competent avian hosts, which promotes the establishment of the bird–mosquito–bird transmission cycle of WNV and USUV. The third zone covers the area between the Confluence basin and the Arcachon Basin.

Study design and sample collection

The study was a cross-sectional prospective study. It took place in April and May 2023, prior to the occurrence of seasonal orthoflavivirus activity, to reflect the exposure of horses to WNV, USUV and TBEV during the summer of 2022, as IgG and neutralizing antibodies tend to have

a longer duration in infected horse sera [28, 29]. Animals were recruited by the Clinique Equine de Conques (Saint-Aubin-de-Branne, Gironde, France) through social media and client mailing, according to our three different zones. All owners signed a consent form, and the treating veterinarians were informed of the procedure. This study was approved by the Ethics Committee for Clinical Research (ComERC) of the Veterinary School of Alfort (EnVA) (Agreement number: 2023-06-23).

A convenience-sampling scheme that involved participants who were easily accessible and willing to participate in the study was applied. Serum samples were collected from 494 adult (>2-year-old) client-owned

equids residing in 39 different stables of the three studied zones: 306 equids from 25 stables in the Confluence zone, 77 equids from 5 stables in the Arcachon zone, and 111 equids from 9 stables in the Intermediate zone (Figure 1). The animals were unvaccinated against WNV and had been living in the sampling area for the past 6 years throughout 2022 without travelling to the Mediterranean region.

The number of equids sampled was stable in size: all horses were sampled from small stables (1 to 6 animals), 10 horses were sampled from medium stables (between 10 and 15 animals), and 15 horses were sampled from large stables (more than 15 animals). The average and median age of the horses was 12 years. The 25% and 75% percentiles were 7 and 17 years, respectively. All the animals were asymptomatic at the time of sampling. Three cases from 2022 were not included in our cohort, although two of the three corresponding stable cases were included (Figure 1).

Serum samples were collected from each included animal. Blood samples were collected in vacutainer dry tubes and centrifuged at 5000 rpm for 5 min within 24 h of collection. The serum was separated, stored at 4 °C, and sent to the French National Reference Laboratory for West Nile virus, ANSES (Maisons-Alfort, France), for further analysis.

In addition to sample collection, each stable manager/owner completed a survey consisting of personal face-to-face interviews to gather information on individual characteristics and stable management as well as their perceptions of the nuisance caused by mosquitoes. This information included age, sex, hair colour, and type of housing. We also collected information about the environment, such as the distance to the nearest water surface and the distance to the northern special protection areas (SPA) located in the Confluence zone. SPAs have been created for the protection of wild bird species listed in Annex 1 of the EU bird directive (Directive 79/409/EEC) or that serve as breeding, moulting, wintering, or staging areas for migrating birds. Five SPAs have been defined in the study area around wetlands (Figure 1).

Serological testing

ELISA tests

The serum samples were first tested for IgG flaviviruses via the commercial Pan-Flavivirus ELISA “ID Screen Flavivirus competition” (Innovative Diagnostic, Montpellier, France). The protocol was performed according to the manufacturer’s instructions. The results are expressed as %S/N. If a sample had a %S/N less than or equal to 40%, the sample was considered positive. If it is strictly greater than 50%, the sample is negative. If the result is between 40 and 50%, the sample is considered doubtful. Positive

and doubtful results were confirmed for the presence of WNV-, USUV- and TBEV-specific neutralizing antibodies using specific virus neutralization tests.

Virus-neutralization test (VNT)

To identify specifically against which flaviviruses the IgG antibodies detected by ELISA are directed, a virus neutralization test (VNT) was carried out for the three main orthoflaviviruses circulating in France: WNV, USUV and TBEV. This test was performed in 96-well plates as described in Beck et al. [20].

Briefly, the sera were diluted in a cascade by a factor of 2, from 1:5 to 1:160, in a final volume of 100 µL. Fifty microliters of virus was added at an infectious dose of 100 TCID₅₀. After 1h30 of incubation at 37 °C and 5% CO₂, 100 µL of Vero cells was added at a concentration of 2.10⁵ cells/mL. The neutralizing antibody titre was obtained by observing the cytopathic effect (CPE) under a light microscope after 3, 4 and 5 days of incubation at 37 °C and 5% CO₂ for WNV, USUV and TBEV, respectively. The last dilution of serum showing no CPE or a proportion of CPE less than a quarter of the well observed was noted as the dilution of serum considered where there was still protection against the virus. The neutralizing antibody titre was therefore the inverse of the serum dilution. A serum sample was considered positive if it displayed protection (no CPE) for a neutralizing dilution ≥ 1:10 for only one orthoflavivirus [30]. Sera neutralizing more than one virus were considered positive for the virus neutralized at a fourfold higher dilution than all other viruses. Sera were identified as those containing antibodies against the virus displaying the highest positive serum dilution. If a fourfold difference in neutralizing antibody titres was not reached, the serum was considered undifferentiated between the viruses. Sera that tested positive by competitive ELISA and negative by VNT were considered negative.

Statistical analysis

All collected variables were described in terms of frequency distribution (qualitative data) or median and range (quantitative data) classified by serological status.

Although we checked during the survey that the sampled horses had no travel history to the Mediterranean region, we did not have access to their travel history inside the study region. Later, some horses had moved between the three zones. In particular, the horses in the Arcachon zone had been living for several months while the Confluence zone was stable the year preceding the survey. Additionally, the Intermediate zone is a rather dry zone that is covered mainly by forests and is ecologically different from the confluence zone, which is a mosaic of pastures, woods, cultivated areas and vineyards. For

this reason, and to minimize the impact of classification errors due to horse movements, we chose to focus on the Confluence zone in the remainder of the statistical analysis. Donkeys were excluded from the analysis because their physiological characteristics differ from those of horses. Data related to the horses and stables of the Confluence zone were analysed using mixed effects logistic regression models, with the stable as a random effect. The dependent variable was the serological status of the animals according to the seroneutralization test. Fixed effects were first individual-level data: animal age (years), sex (male or female), hair colour (light or dark), and type of housing (always on pasture, or both on pasture and indoors). There were 150 water bodies in the confluence zone, mostly segments ($N=68$) of low-flow natural rivers (as the study region is rather flat, with a maximum altitude of just 100 m and no fast-flowing rivers), water reservoirs ($N=50$) and gravel pit water bodies ($N=25$). The others were estuaries, marshes and lakes. *Culex* breeding sites can be found in these habitats, and the distance in kilometres (km) to the nearest water surface was added as a fixed effect.

Two SPAs were present in the Confluence area: a large one to the north and a smaller one to the south (Figure 1). Both were marshland areas. The distances in km to these two SPAs were also added to the list of fixed effects.

Starting from the model with all the fixed effects, we selected the most parsimonious model via backwards model selection on the basis of the likelihood ratio test, p value < 0.05 . The existence of spatial autocorrelation between observations may bias parameter estimation in statistical models. To determine if this was the case, we tested the spatial autocorrelation of the model deviance residuals [31] via Moran's I test for increasing distances in the range of the between-stable distances inside the

Confluence zone. The exponentiated regression coefficients produced odds ratios (ORs) as a measure of the effect of the variables.

We used the nonparametric approach proposed by [32] to test whether the associations between positive VNT results and WNV, USUV and TBEV (i.e., the number of equids positive for 1, 2 or 3 of these viruses) significantly differed from the expected distribution under the null hypothesis of independent positive results. We also carried out this test at a stable level, considering a stable test to be positive if at least one horse was VNT positive.

All the statistical analyses were performed using R 4.3.3 (R Core Team 2024). Mixed effects logistic regression models were fitted using the lme4 package [33]. Model selection was performed using the buildmer package [34]. Spatial autocorrelation was tested using the pgirmess package [35].

Results

This study included 494 adults: 334 horses and 160 ponies, 271 of whom were male and 223 of whom were female. The majority (412 horses) were active at the time of sampling: 328 animals lived in pasture, whereas 166 had a mixed lifestyle (stable and pasture). In terms of hair coat colour, 331 animals had a dark coat, whereas 163 had a light coat.

ELISA and VNT

Among the 494 horses included in the study, 70 were positive for orthoflavivirus antibodies according to competitive ELISA, yielding a seroprevalence rate of 14% (95% CI [11%–18%]). Among them, 60 animals were located in 20 stables in the Confluence zone, 5 horses were housed in 4 stables in the Intermediate zone, and 1 was based on 1 stall in the Arcachon area (Table 1).

Table 1 Comparative serological results among selected horses in the Confluence, Intermediate and Arcachon zones in the Gironde département

	Geographical zone			
	Confluence	Intermediate	Arcachon	
Tested horses/stables	306/25	111/9	77/5	
ELISA results				
Positive horses/stables	64/20	5/4	1/1	
Animal prevalence (95% CI)	21% (16–26%)	5% (2–10%)	1% (0–7%)	
VNT results in ELISA-positive animals:				
Positive horses/stables	WNV	27/13	3/2	1/1
	USUV	14/5	1/1	0/0
	TBEV	6/4	1/1	0/0
Animal prevalence (95% CI)	WNV	9% (6–13%)	3% (1–8%)	1% (0–7%)
	USUV	5% (3–8%)	1% (0–5%)	0% (0–5%)
	TBEV	2% (1–4%)	1% (0–5%)	0% (0–5%)

Within the Confluence zone, 27 equids from 13 different stables were positive for WNV by VNT (9%, 95% CI [6–13%]). Within the same zone, 14 equids from 5 different stables were positive for USUV (5%, 95% CI [3–8%]), and 6 equids from 4 different stables were positive for TBEV (2%, 95% CI [1–4%]). In the intermediate zone, 3 equids housed on 2 stables were positive for WNV (3%, 95% CI [1–8%]), one horse was positive for TBEV, and another horse was positive for USUV neutralizing antibodies (1%, 95% CI [0–5%]). For the Arcachon zone, only one horse was positive for WNV (1%, 95% CI [0–7%]), and no horse was seropositive for the other viruses (Table 1 and Figure 2). As the horse had been living for

several months in a stable Confluence zone the year preceding the survey, we consider it an artefact.

Undifferentiable VNT results were also observed. In total, 24 equids tested positive for WNV, 5 horses tested positive for both WNV and USUV, 2 horses tested positive for WNV and TBEV, and none tested positive for all three viruses simultaneously (WNV, USUV, TBEV). Additionally, 9 horses tested positive for USUV only, 1 horse tested positive for both USUV and TBEV, and 4 horses tested positive for TBEV only (Table 2).

The individual characteristics of the sampled animals as a function of their WNV and USUV serostatus are shown in Table 3. The qualitative comparison revealed

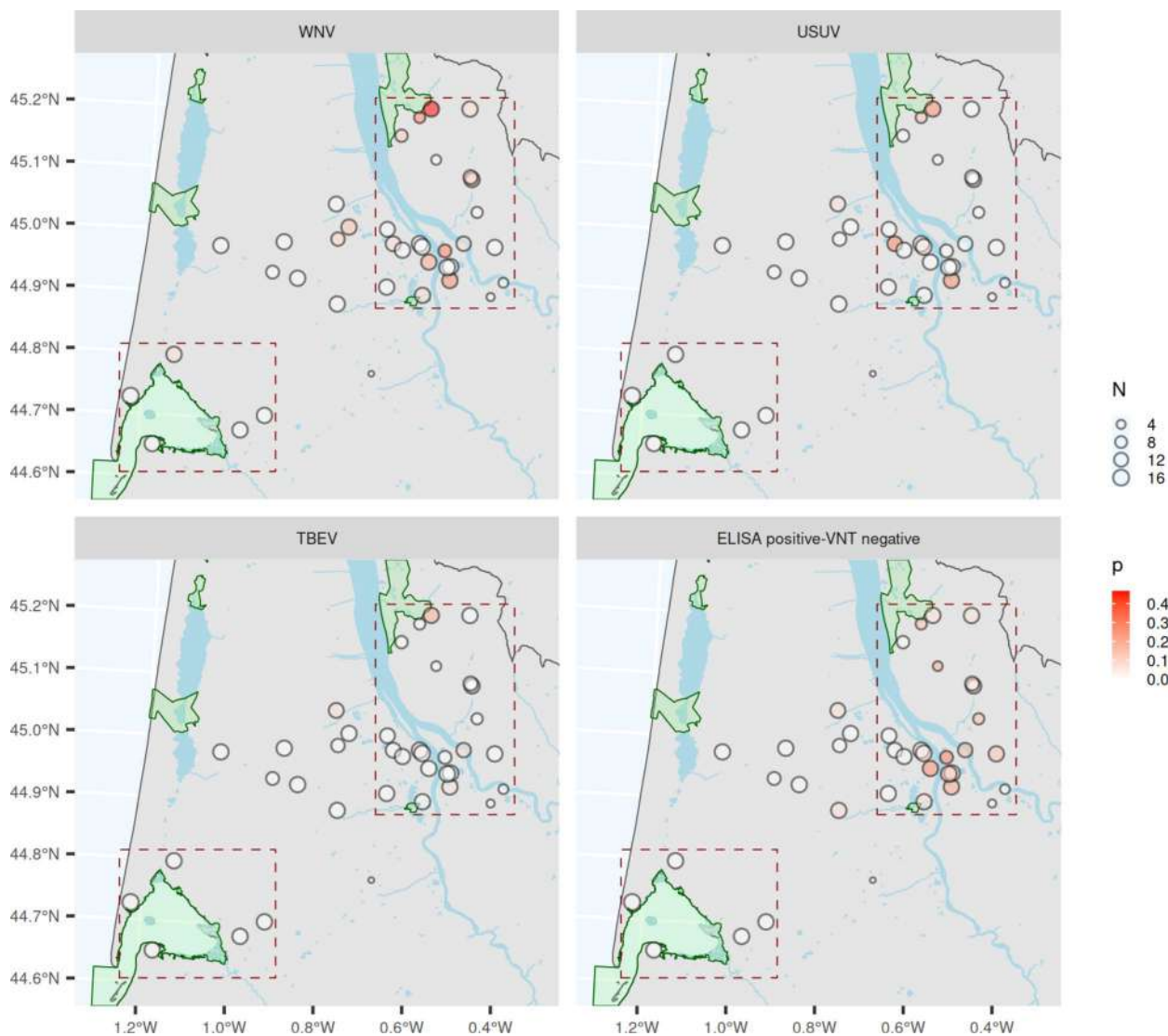


Figure 2 Distribution of WNV, USUV and/or TBEV seropositive equids in the Confluence zone, the Arcachon Basin and the Intermediate zone in the Gironde département in 2023. The circles represent the stables selected for the study, the size of which is proportional to the number of sampled horses. The darker the color of the circles is, the greater the number of seropositive horses.

Table 2 Association between VNT serological status for WNV, USUV and TBEV

WNV	USUV	TBEV	Number of animals
Positive	Positive	Positive	0
Positive	Positive	Negative	5
Positive	Negative	Positive	2
Positive	Negative	Negative	24
Negative	Positive	Positive	1
Negative	Positive	Negative	9
Negative	Negative	Positive	4
Negative	Negative	Negative	449
Total			494

that horses that tested positive for WNV were mainly males kept on pasture only. This does not apply to horses seropositive for USUV.

Risk factor analysis

A mixed effects logistic regression model of VNT serostatus was fitted for WNV and USUV only since,

for TBEV, the number of seropositive stables and equids was very low. Furthermore, we focused our analysis on the Confluence zone, where the vast majority of WNV- and USUV-seropositive equids (306 equids) were located (Table 3). For WNV, starting from the full model (i.e., including all the fixed effects, Additional file 1), backwards model selection allowed us to identify two risk factors for VNT seropositivity: the type of housing with a strongly increased risk in animals always kept on pasture (odds ratio [OR] = 3.64) and the distance to the SPA to the north of the Confluence zone (Figure 1), with a decreasing risk when this distance increased ([OR] = 0.93 for a 1 km increase) (Table 4). Other variables (age, sex, hair colour and distance to the nearest water surface) were not retained in the selected model. No spatial autocorrelation was detected in the residuals of either the full model or the model resulting from the selection procedure, suggesting that these models captured the main determinants of spatial variations in risk. For the USUV, model selection resulted in an empty model (containing the intercept only) and did not allow the identification of any seropositivity risk factors.

Finally, we detected a significant association between WNV and USUV serological status ($p=0.006$), with the

Table 3 Characteristics of horses as a function of WNV and USUV serostatus

Individual horse characteristics	WNV		USUV	
	Positive horses	Negative horses	Positive horses	Negative horses
Sex				
Male	19 (70%)	162 (58%)	8 (57%)	173 (59%)
Female	8 (30%)	117 (42%)	6 (43%)	119 (41%)
Age	13 (2–30)	11 (2–35) ^a	10.5 (6–25) ^a	11 (2–35) ^a
Hair colour				
Dark	14 (52%)	197 (71%)	9 (64%)	202 (69%)
Light	13 (48%)	82 (29%)	5 (36%)	90 (31%)
Type of housing				
Pasture only	23 (85%)	158 (57%)	9 (64%)	172 (59%)
Pastures and indoors	4 (15%)	121 (43%)	5 (36%)	120 (41%)

^a Median and range, in years.

Table 4 Mixed effects logistic regression model of the VNT WNV serological status of the horses sampled in the Confluence zone

Variable ^a	Value	<i>p</i> value	Odds-ratio ^b (95% CI)
Intercept		0.002	0.10 (0.03–0.27)
Type of housing	Pasture and indoors		
	Pasture only	0.04	3.64 (1.11–13.15 -17.47)
Distance to the Northern SPA	Increase by 1 km	0.03	93 (87–99)

^a Reference class for the calculation of the odds ratio.

^b Confidence interval.

number of equids positive for both viruses (five of the 494 equids, located in two stables) being significantly greater than the expected 95% interval under the null hypothesis (0–4 animals). Four of the 39 stable strains were positive for WNV and for USUV. No association was detected between WNV and USUV positivity at the stable level, although the statistical power was lower than that at the individual level.

Discussion

Over the last decade, France has witnessed a changing epidemiology of WNV, USUV and TBEV orthoflaviviruses, with an increased incidence of diseases in vertebrate hosts [3, 16, 36].

From cohorts of equines located in the three defined areas of Gironde, we demonstrated WNV seroprevalence rates ranging from 9% (95% CI [6–13]) in the Confluence area to 3% (95% CI [1–8]) in the intermediate area and 1% (95% CI [0–7]) in the Arcachon Basin. These findings are comparable to those of previous reports from Kosovo [37], Spain [38–41], Germany [42–45] and France [18, 19]. In the Camargue region, which has been considered the historical area of WNV circulation in France since the 1960s, the seroprevalence rate among equines estimated between 2016 and 2020 is slightly higher, at approximately 13% [19].

The highest USUV seroprevalence rate observed in horses was obtained in the Confluence area (5%). It was null near the Arcachon Basin.

Therefore, the Confluence area appears to be a local amplification zone for *Culex-borne* orthoflavivirus circulation. Our data revealed a low percentage of seropositive individuals infected with TBEV (0.3%). Nevertheless, this low seroprevalence rate does not allow us to conclude that TBEV is circulating in south-western France. The virus is known to circulate in the north-eastern part of the country [46–48], with outbreaks detected further south in Jura and other regions [49]. Further investigations in ticks and reservoir animals, such as rodents, are needed to confirm the presence of TBEV in the Nouvelle Aquitaine region.

In this study, we analysed the risk factors that might affect the exposure of horses to WNV infection in the Confluence zone. The risk of exposure to WNV increased when horses were kept outdoors and thus were more exposed to vector bites and when the stable was close to the northernmost special protected areas (SPAs) in the Confluence zone. SPAs were created to preserve the biodiversity they harbor. In and around these areas, bird and vector species assembly may favour local WNV circulation, as already suggested in south-eastern France. This finding is in line with the association, at the European

level, between West Nile disease occurrence in humans and the local diversity of wild bird species [50, 51].

Age, sex, horse color and distance to the nearest water surface were not identified as risk factors associated with WNV and USUV seropositivity. Our data are consistent with those of García-Bocanegra et al. [52] and Vanhomwegen et al. [53], who reported no significant differences among age classes; Durand et al. [18] in France; Hassine et al. in Jordania [54]; and Bażanów et al. in horses in Poland [55], who reported the absence of an effect of sex on WNV and USUV seropositivity. Analyses of the color of horse coats are rare in WNV seroprevalence studies in horses. The results from several research groups are disparate, with studies showing an association between darker color and a lower WNV seroprevalence rate [56, 57] and others demonstrating no correlation between this variable and WNV and USUV seropositivity [58].

Interestingly, we did not find a correlation between the seroprevalence of mosquito-borne viruses and the nuisance caused by mosquitoes evaluated by owners. As it is a personal assessment and may vary from one individual to another, our data here do not allow conclusions to be drawn.

The number of equine and avian cases recorded by the French National Reference Laboratory for West Nile during the 2023 transmission season suggests that the virus tends to establish itself and extend its range [59]. Cases have been detected in départements bordering the Gironde, especially in Charente-Maritime and Charente.

Carrying out seroprevalence surveys such as the one conducted in this study is essential for strengthening monitoring of WNV circulation. This helps us understand viral emergence and evaluate the intensity of circulation in new areas. The seroprevalence survey carried out close to syndromic cases diagnosed in 2022 identified areas with high viral circulation. In 2023, these data enabled mosquito traps to be set in mid-July, providing rapid evidence of active circulation of the West Nile and Usutu viruses in the Confluence area. These data have played a major part in the rapid implementation of the measures needed to ensure the safety of products derived from the human body (blood and organ donations) throughout Gironde and Charente Maritime, a neighbouring département [60]. Horse owners located in the Confluence zone were encouraged to vaccinate their animals to prevent WNV infection in 2024 and the development of severe forms of the disease.

This first seroprevalence study conducted in equids located in Gironde on the Atlantic coast of France revealed that WNV, USUV and an orthoflavivirus belonging to the TBEV serocomplex circulated in this area and infected horses in 2022. Horses, known as sentinels of WNV infection, exhibited intense circulation of this virus in this region

of France as well as equine USUV-specific infection. This study confirmed the usefulness of serosurveys in horses for detecting the circulation of orthoflaviviruses, especially WNV, in specific regions.

Abbreviations

CPE	cytopathic effect
ELISA	enzyme-like immunosorbent assay
IgG	immunoglobulin G
IgM	immunoglobulin M
OR	odd ratio
SPA	special protection area
TBEV	tick-borne encephalitis virus
TCID ₅₀	tissue culture infectious dose 50
USUV	Usutu virus
VNT	virus neutralization test
WNV	West Nile virus

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s13567-025-01508-w>.

Additional file 1. Mixed effects logistic regression model of the VNT WNV serological status of the horses sampled in the confluence zone, including all the independent variables.

Acknowledgements

We would like to thank the equine owners for taking part in the serological survey. This research was conducted in part under the French and European laboratories for West Nile virus.

Authors' contributions

GG, AL, and TT conceptualized the project. CVM, G.G., NC, CMP, EQ, BD, and CL contributed to the methodology; NC, CB, Marianne Depecker, MDM, collected the sera; CVM, Marine Dumarest, TMH, MC, performed the laboratory tests; GG, CVM, BD, CL and NC, analysed the data; NC, CVM, GG, wrote the original draft; CVM, NC, BD, and GG reviewed and edited the original draft; GG, Marianne Depecker and CVM, supervised the study; GG, and CVM contributed to the funding acquisition. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

We acknowledge the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES) and the National Reference Laboratory for West Nile Virus for funding the research activities.

Data availability

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the Ethics Committee for Clinical Research (ComERC) of the Veterinary School of Alfort (EnVA) (Agreement number: 2023–06–23).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 5 July 2024 Accepted: 13 December 2024

Published online: 24 April 2025

References

- Couissinier-Paris P (2006) West Nile virus in Europe and Africa: still minor pathogen, or potential threat to public health? *Bull Soc Pathol Exot* 99:348–354
- Smithburn KC, Hughes TP, Burke AW, Paul JH (1940) A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am J Trop Med Hyg* 51–20:471–492
- Simonin Y (2024) Circulation of West Nile virus and Usutu Virus in Europe: overview and challenges. *Viruses* 16:599
- Jeffrey Root J (2013) West Nile virus associations in wild mammals: a synthesis. *Arch Virol* 158:735–752
- Lecollinet S, Pronost S, Couplier M, Beck C, Gonzalez G, Leblond A, Tritz P (2019) Viral equine encephalitis, a growing threat to the horse population in Europe? *Viruses* 12:23
- Angenvoort J, Brault AC, Bowen RA, Groschup MH (2013) West Nile viral infection of equids. *Vet Microbiol* 167:168–180
- Cavalleri JV, Korbacska-Kutasi O, Leblond A, Paillot R, Pusterla N, Steinmann E, Tomlinson J (2022) European College of Equine Internal Medicine consensus statement on equine flaviviridae infections in Europe. *J Vet Intern Med* 36:1858–1871
- Iwamoto M, Jernigan DB, Guasch A, Trepka MJ, Blackmore CG, Hellinger WC, Pham SM, Zaki S, Lanciotti RS, Lance-Parker SE, DiazGranados CA, Winquist AG, Perlino CA, Wiersma S, Hillyer KL, Goodman JL, Marfin AA, Chamberland ME, Petersen LR (2003) Transmission of West Nile virus from an organ donor to four transplant recipients. *N Engl J Med* 348:2196–2203
- Pisani G, Cristiano K, Pupella S, Liumbruno GM (2016) West Nile Virus in Europe and safety of blood transfusion. *Transfus Med Hemother* 43:158–167
- Européenne LC (2018) Règlement d'exécution (UE) 2018/1882 de la commission. *Journal officiel de l'Union européenne* (in French)
- Assaid N, Mousson L, Moutailler S, Arich S, Akarid K, Monier M, Beck C, Lecollinet S, Failloux AB, Sarih M (2020) Evidence of circulation of West Nile virus in *Culex pipiens* mosquitoes and horses in Morocco. *Acta Trop* 205:105414
- Benjelloun A, El Harrak M, Calistri P, Loutfi C, Kabbaj H, Conte A, Ippoliti C, Danzetta ML, Belkadi B (2017) Seroprevalence of West Nile virus in horses in different Moroccan regions. *Vet Med Sci* 3:198–207
- Ben-Mostafa KK, Savini G, Di Gennaro A, Teodori L, Leone A, Monaco F, Alaoqib MMA, Rayes AA, Dayhum A, Eldaghayes I (2023) Evidence of West Nile virus circulation in horses and dogs in Libya. *Pathogens* 13:41
- Braks MAH, Duijster JW, Stroo CAJ (2022) West Nile virus unexpectedly in the Netherlands. *Ned Tijdschr Geneesk* 166:D6278 (in Dutch)
- Cadar D, Simonin Y (2022) Human Usutu virus infections in Europe: a new risk on horizon? *Viruses* 15:77
- Van Heuverswyn J, Hallmaier-Wacker LK, Beauté J, Gomes Dias J, Haussig JM, Busch K, Kerlik J, Markowicz M, Mäkelä H, Nygren TM, Orliková H, Socan M, Zbrzeźniak J, Żygotiene M, Gossner CM (2023) Spatiotemporal spread of tick-borne encephalitis in the EU/EEA, 2012 to 2020. *Euro Surveill* 28:2200543
- Ziegler U, Lühken R, Keller M, Cadar D, van der Grinten E, Michel F, Albrecht K, Eiden M, Rinder M, Lachmann L, Höper D, Vina-Rodriguez A, Gaede W, Pohl A, Schmidt-Chanasit J, Groschup MH (2019) West Nile virus epizootic in Germany. *Antiviral Res* 162:39–43
- 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. *Emerg Infect Dis* 8:777–782
- Constant O, Gil P, Barthelemy J, Bolloré K, Foulongne V, Desmetz C, Leblond A, Desjardins I, Pradier S, Joulie A, Sandoz A, Amaral R, Boisseau M, Rakotoarivony I, Baldet T, Marie A, Frances B, Reboul Salze F, Tinto B, Van de Perre P, Salinas S, Beck C, Lecollinet S, Gutierrez S, Simonin Y (2022) One Health surveillance of West Nile and Usutu viruses: a repeated cross-sectional study exploring seroprevalence and endemicity in Southern France, 2016 to 2020. *Euro Surveill* 27:2200068
- Beck C, Leparoc Goffart I, Franke F, Gonzalez G, Dumarest M, Lowenski S, Blanchard Y, Lucas P, Lamballerie X, Grard G, Durand GA, Zientara S, Tapprest J, L'Ambert G, Durand B, Desvaux S, Lecollinet S (2020) Contrasted epidemiological patterns of West Nile virus lineages 1 and 2 infections in France from 2015 to 2019. *Pathogens* 9:908
- Constant O, Bolloré K, Clé M, Barthelemy J, Foulongne V, Chenet B, Gomis D, Virolle L, Gutierrez S, Desmetz C, Moares RA, Beck C, Lecollinet S, Salinas

- S, Simonin Y (2020) Evidence of exposure to USUV and WNV in zoo animals in France. *Pathogens* 9:1005
22. Lecollinet S, Blanchard Y, Manson C, Lowenski S, Laloy E, Quenault H, Touzain F, Lucas P, Eraud C, Bahuon C, Zientara S, Beck C, Decors A (2016) Dual emergence of Usutu virus in common blackbirds, Eastern France, 2015. *Emerg Infect Dis* 22:2225
 23. Decors A, Beck C, Lemberger K, Eraud C, Desvoux S, Chaigneau P, Baurier F, Blanchard Y, Lecollinet S (2019) 2018, en France : record de circulation du virus Usutu Faune Sauvage 324: 9–14 (in French)
 24. Duvignaud A, Bigeard C, Fontaine A, Grard G, Touzet T, Migne C, Gallian P, Malvy D, de Lamballerie X, Gonzalez G (2024) Investigation One Health de l'émergence des virus West Nile et Usutu en Nouvelle Aquitaine. *Med Mal Infect* 3:59 (in French)
 25. Velay A, Solis M, Kack-Kack W, Gantner P, Maquart M, Martinot M, Augereau O, De Briel D, Kieffer P, Lohmann C, Poveda JD, Cart-Tanneur E, Argemi X, Leparç-Goffart I, de Martino S, Jaulhac B, Raguert S, Wendling MJ, Hansmann Y, Fafi-Kremer S (2018) A new hot spot for tick-borne encephalitis (TBE): a marked increase of TBE cases in France in 2016. *Ticks Tick Borne Dis* 9:120–125
 26. TBEV Wgo (2023) Tick-borne encephalitis virus (TBEV) – Update of the French High Council for Public Health opinion of July 23, 2020 Haut-Conseil de la Santé Publique
 27. Gonzalez G, Bigeard C, Migné C, Touzet T, Fontaine A, L'Ambert G, De Lamballerie X, Zientara S, Duvignaud A, Malvy D (2023) Circulation active du virus West-Nile en Gironde, région Nouvelle-Aquitaine – point au 04/08/2023 Plateforme ESA (in French)
 28. Khatibzadeh SM, Gold CB, Keggan AE, Perkins GA, Glaser AL, Dubovi EJ, Wagner B (2015) West Nile virus-specific immunoglobulin isotype responses in vaccinated and infected horses. *Am J Vet Res* 76:92–100
 29. Ostlund EN, Crom RL, Pedersen DD, Johnson DJ, Williams WO, Schmitt BJ (2001) Equine West Nile encephalitis, United States. *Emerg Infect Dis* 7:665–669
 30. Beck C, Desprès P, Paulous S, Vanhomwegen J, Lowenski S, Nowotny N, Durand B, Garnier A, Blaise-Boisseau S, Guitten E, Yamanaka T, Zientara S, Lecollinet S (2015) A high-performance multiplex immunoassay for serodiagnosis of Flavivirus-associated neurological diseases in horses. *Biomed Res Int* 2015:678084
 31. Pfeiffer DJ, Robinson TP, Stevenson M, Stevens KB, Rogers DJ, Clements ACA (2008) Spatial analysis in epidemiology. Oxford University Press, Oxford
 32. Vaumourin E (2014) Modélisation statistique des associations et des interactions entre des parasites transmis par des vecteurs, à partir de données issues d'études transversales. PhD Thesis, Institut National de la Recherche Agronomique, Unité de Recherche d'Epidémiologie Animale (in French)
 33. Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S (2015) Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J Stat Softw* 67:1–48
 34. Voeten CC (2023) builder: Stepwise elimination and term reordering for mixed-effects regression
 35. P G pgirmess (2024): Spatial analysis and data mining for field ecologists, R package version 2.0.3
 36. Čabanová V, Kerlik J, Kirschner P, Rosochová J, Klempa B, Sláviková M, Ličková M (2023) Co-circulation of West Nile, Usutu, and tick-borne encephalitis viruses in the same area: a great challenge for diagnostic and blood and organ safety. *Viruses* 15:366
 37. Rexhepi A, Sherifi K, Berxholi K, Xhekaj B, Muja-Bajraktari N, Özkul A, von Possel R, Emmerich P (2021) First serological evidence of West Nile virus among equines and birds in Kosovo, 2018–2019. *Vector Borne Zoonotic Dis* 21:116–120
 38. Magallanes S, Llorente F, Ruiz-López MJ, Martínez-de la Puente J, Soriguier R, Calderon J, Jiménez-Clavero M, Aguilera-Sepúlveda P, Figuerola J (2023) Long-term serological surveillance for West Nile and Usutu virus in horses in south-West Spain. *One Health* 17:100578
 39. Napp S, Llorente F, Beck C, Jose-Cunilleras E, Soler M, Pailler-García L, Amaral R, Aguilera-Sepúlveda P, Pifarré M, Molina-López R, Obón E, Nicolás O, Lecollinet S, Jiménez-Clavero M, Busquets N (2021) Widespread circulation of flaviviruses in horses and birds in Northeastern Spain (Catalonia) between 2010 and 2019. *Viruses* 13:2404
 40. Jiménez-Clavero MA, Llorente F, Sotelo E, Soriguier R, Gómez-Tejedor C, Figuerola J (2010) West Nile virus serosurveillance in horses in Donana, Spain, 2005 to 2008. *Vet Rec* 167:379–380
 41. García-Carrasco JM, Muñoz AR, Olivero J, Segura M, García-Bocanegra I, Real R (2023) West Nile virus in the Iberian Peninsula: using equine cases to identify high-risk areas for humans. *Euro Surveill* 28:2200844
 42. Gothe LMR, Ganzenberg S, Ziegler U, Obiegala A, Lohmann KL, Sieg M, Vahlenkamp TW, Groschup MH, Hörügel U, Pfeffer M (2023) Horses as sentinels for the circulation of flaviviruses in Eastern-Central Germany. *Viruses* 15:1108
 43. Bergmann F, Trachsel DS, Stoeckle SD, Bernis Sierra J, Lübke S, Groschup MH, Gehlen H, Ziegler U (2022) Seroepidemiological survey of West Nile Virus infections in horses from Berlin/Brandenburg and North Rhine-Westphalia, Germany. *Viruses* 14:243
 44. Bestehorn M, Weigold S, Kern WV, Chitimia-Dobler L, Mackenstedt U, Dobler G, Borde JP (2018) Phylogenetics of tick-borne encephalitis virus in endemic foci in the upper Rhine region in France and Germany. *PLoS One* 13:e0204790
 45. Ganzenberg S, Sieg M, Ziegler U, Pfeffer M, Vahlenkamp TW, Hörügel U, Groschup MH, Lohmann KL (2022) Seroprevalence and risk factors for equine West Nile virus infections in Eastern Germany, 2020. *Viruses* 14:1191
 46. Bournez L, Umhang G, Moinet M, Boucher JM, Demerson JM, Caillot C, Legras L, Devillers E, Hansmann Y, Velay A, Richomme C, Moutailler S, Boué F (2020) Disappearance of TBEV circulation among rodents in a natural focus in Alsace, Eastern France. *Pathogens* 9:930
 47. Gonzalez G, Bournez L, Moraes RA, Marine D, Galon C, Vorimore F, Cochlin M, Nougairède A, Hennechart-Collette C, Perelle S, Leparç-Goffart I, Durand GA, Grard G, Bénet T, Danjou N, Blanchin M, Lacour SA, Franck B, Chenut G, Mainguet C, Simon C, Brémont L, Zientara S, Moutailler S, Martin-Latil S, Dheilily NM, Beck C, Lecollinet S (2022) A One-Health approach to investigating an outbreak of alimentary tick-borne encephalitis in a non-endemic area in France (Ain, Eastern France): a longitudinal serological study in livestock, detection in ticks, and the first tick-borne encephalitis virus isolation and molecular characterisation. *Front Microbiol* 13:863725
 48. Parfut A, Laugel E, Baer S, Gonzalez G, Hansmann Y, Wendling MJ, Fafi-Kremer S, Velay A (2023) Tick-borne encephalitis in pediatrics: an often overlooked diagnosis. *Infect Dis Now* 53:104645
 49. Bournez L, Umhang G, Faure E, Boucher JM, Boué F, Jourdain E, Sarasa M, Llorente F, Jiménez-Clavero MA, Moutailler S, Lacour SA, Lecollinet S, Beck C (2019) Exposure of wild ungulates to the Usutu and tick-borne encephalitis viruses in France in 2009–2014: evidence of undetected flavivirus circulation a decade ago. *Viruses* 12:10
 50. 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* 157:711–713
 51. Durand B, Tran A, Balança G, Chevalier V (2017) Geographic variations of the bird-borne structural risk of West Nile virus circulation in Europe. *PLoS One* 12:e0185962
 52. García-Bocanegra I, Jaén-Téllez JA, Napp S, Arenas-Montes A, Fernández-Morente M, Fernández-Molera V, Arenas A (2012) Monitoring of the West Nile virus epidemic in Spain between 2010 and 2011. *Transbound Emerg Dis* 59:448–455
 53. Vanhomwegen J, Beck C, Desprès P, Figuerola A, García R, Lecollinet S, López-Roig M, Manuguerra JC, Serra-Cobo J (2017) Circulation of zoonotic arboviruses in equine populations of Mallorca Island (Spain). *Vector Borne Zoonotic Dis* 17:340–346
 54. Ben Hassine T, De Massis F, Calistri P, Savini G, BelHaj Mohamed B, Ranen A, Di Gennaro A, Sghaier S, Hammami S (2014) First detection of co-circulation of West Nile and Usutu viruses in equids in the south-west of Tunisia. *Transbound Emerg Dis* 61:385–389
 55. Bażanów B, Jansen van Vuren P, Szymański P, Stygar D, Frącka A, Twardoń J, Kozdrowski R, Pawęska JT (2018) A survey on West Nile and Usutu viruses in horses and birds in Poland. *Viruses* 10:87
 56. Aharonson-Raz K, Lichten-Peled A, Tal S, Gelman B, Cohen D, Klement E, Steinman A (2014) Spatial and temporal distribution of West Nile virus in horses in Israel (1997–2013)—from endemic to epidemics. *PLoS One* 9:e113149
 57. Azmi K, Tirosch-Levy S, Manasrah M, Mizrahi R, Nasereiddin A, Al-Jawabreh A, Ereqat S, Abdeen Z, Lustig Y, Gelman B, Schwartz G, Steinman A (2017) West Nile virus: seroprevalence in animals in Palestine and Israel. *Vector Borne Zoonotic Dis* 17:558–566

58. Guerrero-Carvajal F, Bravo-Barriga D, Martín-Cuervo M, Aguilera-Sepúlveda P, Ferraguti M, Jiménez-Clavero M, Llorente F, Alonso JM, Frontera E (2021) Serological evidence of co-circulation of West Nile and Usutu viruses in equids from western Spain. *Transbound Emerg Dis* 68:1432–1444
59. European Center for diseases prevention and control 2023 (2024) Epidemiological update: West Nile virus transmission season in Europe. 2023
60. Haut Conseil de la Santé Publique (2022) Avis sur la sécurisation des produits du corps humain dans un contexte de circulation du virus West Nile en France métropolitaine (in French)

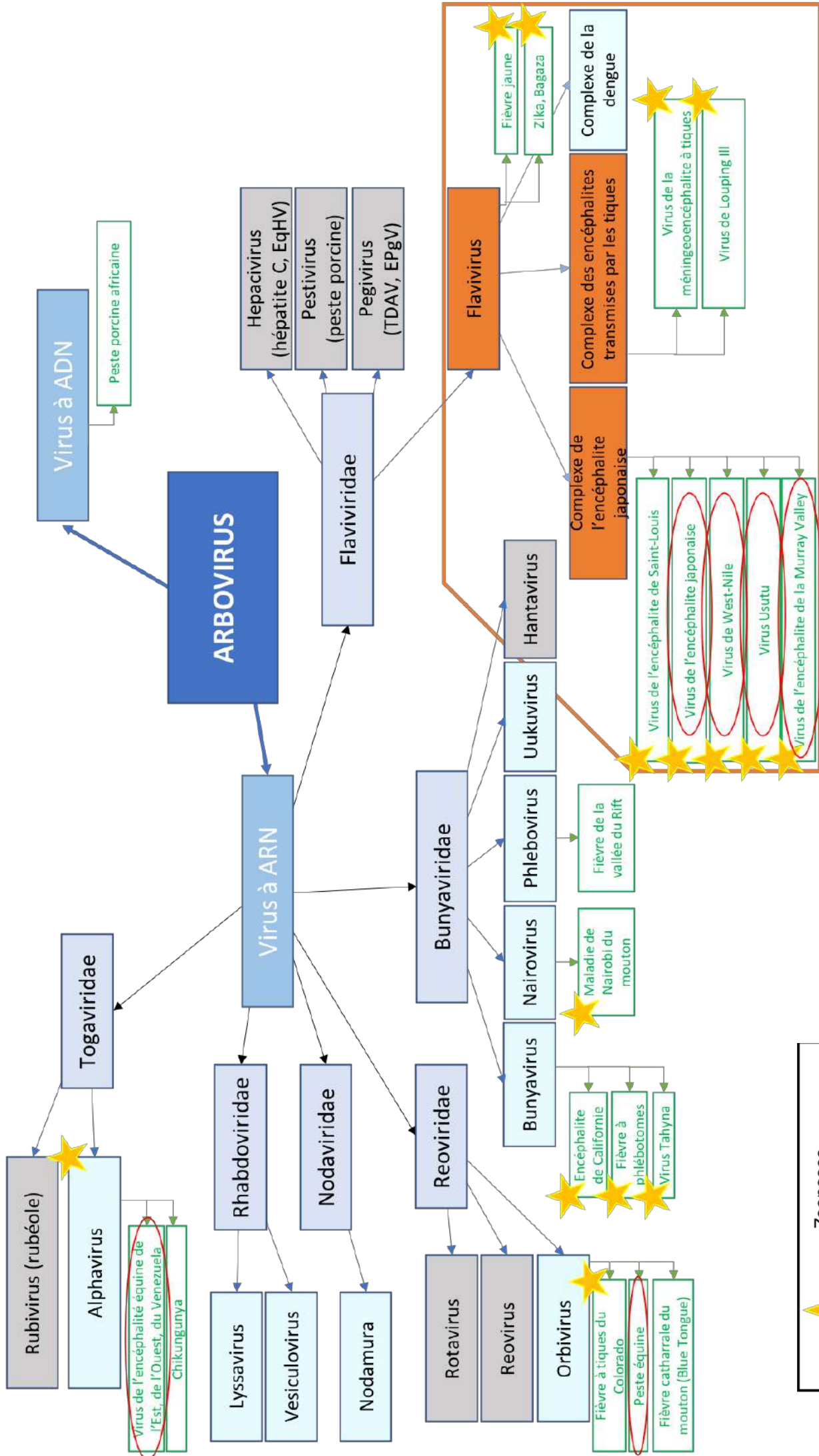
Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Annexe 2 : Organigramme de classification des arbovirus (réalisation : Margaux De Mas)

Orange : Orthoflavivirus capables d'infecter les équidés - Bleu : arbovirus n'affectant pas les équidés - Gris : familles ne contenant pas de virus à l'origine d'arboviroses.

Il est à noter que les membres des autres familles ne sont pas tous des arbovirus. Les exemples d'arboviroses donnés en vert ne constituent pas une liste exhaustive des maladies provoqués par les agents viraux des différentes familles.



Zoonoses

Virus responsables d'infections chez les équidés

Virus de l'encéphalite équine de l'Est, de l'Ouest, du Venezuela

Chikungunya

Fièvre à tiques du Colorado

Peste équine

Fièvre catharrale du mouton (Blue Tongue)

Encéphalite de Californie

Fièvre à phlébotomes

Virus Tahyna

Maladie de Nairobi du mouton

Fièvre de la vallée du Rift

Virus de l'encéphalite de Saint-Louis

Virus de l'encéphalite japonaise

Virus de West-Nile

Virus Usutu

Virus de l'encéphalite de la Murray Valley

Virus de la méningoencéphalite à tiques

Virus de Louping III

Fièvre jaune

Zika, Bagaza

Complexe de l'encéphalite japonaise

Complexe des encéphalites transmises par les tiques

Complexe de la dengue

Flaviviridae

Hepacivirus (hépatite C, EqHV)

Pestivirus (peste porcine)

Pegivirus (TDAV, EPGV)

ARBOVIRUS

Virus à ARN

Virus à ADN

Peste porcine africaine

Rubivirus (rubéole)

Alphavirus

Togaviridae

Lyssavirus

Vesiculovirus

Nodamura

Nodaviridae

Rhabdoviridae

Rotavirus

Reovirus

Orbivirus

Reoviridae

Bunyavirus

Nairovirus

Phlebovirus

Bunyaviridae

Hantavirus

Uukuvirus

Flavivirus

Flaviviridae

Virus à ARN

Virus à ADN

ARBOVIRUS

Annexe 3 : Consentement éclairé utilisé au cours de l'enquête de séroprévalence

ÉTUDE DE CIRCULATION DU VIRUS WEST NILE / USUTU / ENCÉPHALITE À TIQUES EN GIRONDE

Consentement éclairé des propriétaires ou des responsables d'écuries

L'objectif de cette étude est de déterminer l'exposition des équidés à trois agents pathogènes que sont le virus de la fièvre de West Nile, le virus Usutu et les virus de l'encéphalite à tiques,

Prélèvements réalisés chez les propriétaires ou responsables d'écurie volontaires pour participer à l'étude

Les résultats des prélèvements sur chevaux vous seront transmis gratuitement par courrier ainsi qu'éventuellement à votre vétérinaire traitant si vous le souhaitez (délai prévu : juin 2023).

Je soussigné·e, Madame, Monsieur,
résidant.....

Autorise les responsables de l'étude à utiliser les informations recueillies dans le cadre de leur étude.

Autorise à transmettre les résultats des analyses à mon vétérinaire traitant.

J'ai bien noté que l'ensemble des informations est confidentiel, 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 de :

- Dr Gaëlle GONZALEZ, PhD, Responsable du laboratoire national de référence West-Nile et adjointe au directeur du laboratoire de référence de l'Union Européenne sur les maladies équine, 14 rue Pierre et Marie Curie 94701 Maisons-Alfort (Tel : +33 (0)1 43 96 73 76, Email : Gaëlle.gonzalez@anses.fr)
- Dr Marianne DEPECKER, vétérinaire spécialisée en médecine interne équine, Clinique de Conques 3 Château de Conques 33420 Saint-Aubin De Branne (Tel : 05.57.74.94.21 Email : mdepecker@cliniquedeconques.com)
- Pr. Agnès LEBLOND, Professeur à Vetagrosup, 1 avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Etoile (Tel : 04 78 87 27 33, Fax : 04 78 87 26 75, Email : agnes.leblond@vetagro-sup.fr)
- Dr Christel Marcillaud-Pitel, DMV - directeur RESPE (Email : c.marcillaud-pitel@respe.net)

Fait le.....

à.....

Signature :

Annexe 4 : Flyer de communication utilisé au cours de l'enquête de séroprévalence



Étude de la circulation du virus West Nile / Usutu / Encéphalite à tiques en Gironde

Contexte :

Des épisodes de fièvre parfois accompagnés de symptômes neurologiques (trouble de la démarche, du comportement, de la conscience) apparaissent régulièrement chez les Equidés en Gironde. Ils sont non spécifiques, et la cause demeure souvent inconnue.

Le virus West Nile est communément rencontré dans le sud-est de la France. En 2022, des cas avérés d'infection au virus West Nile ont été recensés dans la zone du Blayais et l'estuaire de la Gironde chez des chevaux présentant des troubles neurologiques, ainsi qu'un cas d'Usutu chez l'humain. Ces maladies sont exclusivement transmises par les moustiques, infectés par les oiseaux. Les équidés et les humains peuvent tomber malade, mais ne peuvent pas transmettre la maladie à un moustique.

Une meilleure connaissance des zones à risques permettra, pour le vétérinaire traitant, de prescrire judicieusement les tests de dépistage pour le diagnostic et de mettre en place des mesures de prévention. La fièvre de West Nile, Usutu ou

l'encéphalite à tiques n'entraînent pas de conséquences administratives sur les mouvements des chevaux.

Objectifs de l'étude :

Déterminer l'exposition des équidés à trois agents pathogènes que sont le virus de West Nile, le virus Usutu, et le virus de l'encéphalite à tiques dans le Blayais, l'estuaire de Gironde et le bassin d'Arcachon.

Prélèvements réalisés sur les équidés (chevaux, poneys, ânes), chez les propriétaires volontaires pour participer à l'étude :

- Un prélèvement de sang est réalisé sur les équidés âgés de plus de 1 an de l'effectif, qui respectent les critères suivants :
- Présents en Gironde entre juin 2022 et décembre 2022
- Non vaccinés vis-à-vis du virus West Nile
- N'ayant pas voyagé dans le pourtour méditerranéen (dont la Corse) durant les 6 dernières années

Au maximum, 15 animaux répondant à ces critères seront prélevés par écurie, pour atteindre 500 animaux dans la zone étudiée.

Ces prélèvements seront analysés gratuitement par le laboratoire de référence européen pour rechercher les trois virus cités.

Résultats attendus :

Pour chacun de vos animaux, vous recevrez le résultat des trois analyses indiquant la présence

ou l'absence d'anticorps dirigés contre les trois virus étudiés.

Ces résultats individuels et confidentiels seront transmis par courrier aux propriétaires et éventuellement aux vétérinaires des chevaux.

Une synthèse des résultats anonymisés sera présentée aux propriétaires-éleveurs participants en fin d'étude. Cette étude permettra d'estimer la circulation de ces virus dans la population équine de Gironde.

CONTACT : Drs Marianne Depecker, Gaëlle Gonzalez, Agnès Leblond, Christel Marcillaud-Pitel, Clément Bigeard

Courriel :

- mdepecker@cliniquedeconques.com
- gaelle.gonzalez@anses.fr
- agnes.leblond@vetagro-sup.fr
- c.marquillaud-pitel@respe.net
- clement.bigeard@gironde.gouv.fr



anses



VetAgro Sup
Campus Vétérinaire de Lyon



Réseau d'Épidémiologie et de Surveillance en Pathologie Équine



Annexe 5 : Questionnaire destiné aux détenteurs des équidés ayant participé à l'enquête de séroprévalence

Enquête sérologique équidés WN en Gironde Mode d'emploi

1 Arrivée sur l'écurie

Présentation de l'étude avec le Flyer (importance ++ : confidentialité, résultats transmis, réunion avec autres professionnels envisagée en juillet)

Signature du Consentement éclairé

2 Rappel des critères d'inclusions et récupération des carnets

- L'animal était présent sur les lieux entre juin et décembre 2022 (tolérance = +/-2 mois)
- Pas de voyage sur le territoire méditerranéen dans les 6 dernières années
- L'animal doit avoir plus de 2 ans
- L'animal ne doit PAS être vacciné contre le West Nile

3 Questions générales écuries

Quel est votre vétérinaire traitant ?

Nom :

Sachant que les résultats (négatifs comme positifs) vous seront transmis, voulez-vous que nous lui transmettions également les résultats ?

Oui / Non

Combien d'animaux sont présents ?

Cheval :	Poney :	Âne :	Bovins :
Ovins :	Caprins :	Chiens :	Poules :
Canards :	Colombidés :	Autres :	

Des équidés sont-ils vaccinés contre le WN ?

Oui / Non

Proximité d'une zone humides à moins de 7 km ?

Oui / Non

Proximité d'une zone de chasse à moins de 7 km ?

Oui / Non

Score de Nuisance

Pensez-vous que les animaux sont gênés par les moustiques :

Pas du tout d'accord / Pas d'accord / Neutre / D'accord / Tout à fait d'accord

Pensez-vous que les humains sont gênés par les moustiques :

Pas du tout d'accord / Pas d'accord / Neutre / D'accord / Tout à fait d'accord

Conseils :

Poser des questions sur l'hébergement des animaux, l'utilisation de répulsifs et de couvertures à ce stade, souvent tous les animaux vivent dans les mêmes conditions

Pour le questionnaire chevaux : date d'acquisition la plus précise possible pour l'année 2022, demander le mois pour 2021-2020, sinon l'année suffit.

Pas besoin impératif d'une zone de provenance précise si l'animal est présent depuis 6 ans ou plus

4 Questionnaire Animaux

	Nom	Date d'acquisition - arrivée	Provenance	Robe Grise ?	Activité *	Répulsif chimique ?*	Périodicité *	Couverture*	Bonnet*	Hébergement jour *	Nuit	WE Année	Maladie durant 2022 ?	Date
1														
2														
3														
4														
5														
6														
7														
8														
9														
10														
11														
12														
13														
14														
15														
16														
17														
18														

Activité : S = Sport, L = Loisir, SA = Sans activité, C = Club, E= Elevage

Répulsif chimique : Indiquer « non » ou la marque / molécule

Périodicité : tous les mois, tous les trois mois...

Colonne WE / Année : préciser si variation le week end ou durant l'année (bien demander et creuser un peu)

Bonnet, couverture : demander quand et pourquoi ils les portent

Hébergement : Paddock/pâtûre = P, Box = B (ouvert), Stalle = S (fermé ++)

Auteur : DE MAS Margaux

Titre : Bilan d'une étude de séroprévalence des Orthoflavivirus West Nile, Usutu et du virus de l'encéphalite à tiques sur un échantillon de la population équine de Gironde en 2023

Résumé : Une étude de séroprévalence des Orthoflavivirus West Nile (WNV), Usutu (USUV) et Tick-borne encephalitis virus (TBEV) a été réalisée en Gironde, au printemps 2023, suite à l'émergence du WNV chez les équidés dans ce département en 2022. Le statut sérologique de 494 chevaux, répartis sur trois zones géographiques (Confluence, Zone intermédiaire et Bassin d'Arcachon), a été établi par prélèvement sanguin pour ces trois virus. Les résultats montrent une séroprévalence globale de 14% pour les trois orthoflavivirus, avec les taux les plus élevés observés dans la zone de Confluence : 9% pour WNV et 5% pour USUV. Le type d'hébergement (pâturage exclusif) et la distance par rapport à la zone de protection spéciale des oiseaux (SPA) la plus proche étaient des facteurs de risque significatifs pour la séropositivité au WNV. Cette étude, la première sur la côte atlantique française, démontre une circulation active du WNV dans cette région, ainsi que la présence du virus USUV chez les équidés.

Mots-clés : Orthoflavivirus, West Nile, Usutu, TBEV, séroprévalence, One Health

Title : Assessment of a seroprevalence study of West Nile, Usutu, and Tick-borne encephalitis viruses in a sample of the equine population in Gironde in 2023

Abstract : A seroprevalence study of West Nile virus (WNV), Usutu virus (USUV), and Tick-borne encephalitis virus (TBEV) was conducted in Gironde in the spring of 2023, following the emergence of WNV in equids in this department in 2022. The serological status of 494 horses, located in three geographical areas (Confluence, Intermediate Zone, and Arcachon Basin), was assessed through blood sampling for these three viruses. The results showed an overall seroprevalence of 14% for the three orthoflaviviruses, with the highest rates observed in the Confluence zone : 9% for WNV and 5% for USUV. Housing type (exclusive pasture) and the distance to the nearest Special Protection Area (SPA) for birds were identified as significant risk factors for WNV seropositivity. This study, the first of its kind on the French Atlantic coast, demonstrates active circulation of WNV in this region as well as the presence of USUV in equids.

Key-words : Orthoflavivirus, West Nile, Usutu, TBEV, seroprevalence, One Health