

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE EL-HADJ LAKHDAR-BATNA
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES
ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES



THESE

Pour L'Obtention Du Diplôme De

DOCTORAT ES-SCIENCES

Option

Sciences Vétérinaires

Présentée Par :

LAABASSI Farouk

THEME

**Étude de l'influence de l'infection par les virus de la grippe et de la
rhinopneumonie sur certains paramètres sanguins
chez le cheval de course**

JURY:

S. MEHENNAOUI
B. MAMACHE
D. GUETARNI
R. OUZROUT
M. BENSOUILAH
L. AOUN

Prof. - Université de Batna : Président
Prof. - Université de Batna : Rapporteur
Prof. - Université de Blida : Examineur
Prof. - Université d'El-Tarf : Examineur
Prof. - Université de Annaba : Examineur
Prof. - Université d'El-Tarf : Examinatrice

ANNEE UNIVERSITAIRE: 2012/2013

Remerciements

A Monsieur, le Professeur MEHANNEOUI Smail

De l'Institut des Sciences Vétérinaires et des Sciences Agronomiques de Batna,
qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

hommage respectueux.

A Monsieur, le Professeur MAMACHE Bakir

De l'Institut des Sciences Vétérinaires et des Sciences Agronomiques de Batna,
qui a bien voulu accepter mon sujet de thèse et me soutenir tout au long de sa réalisation et sa
rédaction,

en guise de témoignage de ma profonde gratitude.

A Monsieur, le Professeur OUZROUT Rachid

De l'Institut des Sciences Vétérinaires de l'Université d'El-Tarf,
pour nous avoir fait l'honneur de juger ce travail de thèse.

sincères remerciements.

A Monsieur, le Professeur GUETARNI Djamel

De la Faculté de Biologie de Blida,
pour ses commentaires judicieux sur notre travail.

sincères remerciements.

A Monsieur, le Professeur BEN SOUILAH Mourad

De la Faculté de Biologie de Annaba,

pour ses commentaires judicieux sur notre travail.

sincères remerciements.

A Madame, le Professeur AOUN Leila

De l'Institut des Sciences Vétérinaires de l'Université d'El-Tarf,

pour nous avoir fait l'honneur de juger notre travail.

sincères remerciements.

A Monsieur, HANS Aymeric, Ph. D

Au Docteur LAUGIER Claire, Directrice

du Laboratoire de Pathologie Équine, ANSES de Dozulé, France,

pour m'avoir accueilli et supporté, pour leur disponibilité et leur gentillesse, pour leur aide précieuse dans la réalisation de ce travail et pour leur franche collaboration.

mes plus sincères remerciements.

Au Docteur, FORTIER Guillaume, Directeur

du Laboratoire Franck Duncombe, Université de Caen, Basse Normandie- France,

qui a bien voulu accepter mon Co-Encadrement en thèse, malgré l'absence d'officialisation de ce Co-Encadrement.

sincères remerciements.

A mes parents,

en témoignage de mon affection et en remerciement pour l'immense soutien qu'ils m'ont toujours apporté.

A ma femme,

pour son soutien moral durant toute la durée de la rédaction de cette thèse.

A mes filles, Rim et Chehd

A mes frères et sœurs.

A tous mes neveux et nièces.

A tous les autres que je n'ai pas pu citer, mais qui se reconnaîtront, je ne les oublie pas...

Sommaire

	Page
Introduction	
Partie bibliographique	
Chapitre I : Le Virus Influenza Équin (EIV)	
1. Importance.....	1
2. Classification.....	1
3. Structure générale de l'EIV.....	3
4. Les glycoprotéines d'enveloppe.....	5
4.1 L'hémagglutinine (HA).....	5
4.2 La neuraminidase (NA).....	6
5. Mode d'évolution des protéines HA et NA de l'EIV.....	6
6. Cycle réplicatif du virus influenza.....	7
6.1 Activation du virus.....	7
6.2 Fixation et endocytose.....	8
6.3 Libération des segments ribonucléoprotéiques.....	8
6.4 Transcription et réplication du génome viral.....	8
6.5 Traduction, transport et assemblage.....	9
6.6 Encapsidation et bourgeonnement.....	10
7. Immunité et l'EIV.....	12
7.1 Immunité innée.....	12
7.2 Immunité adaptative.....	12
Chapitre II : La Grippe Équine (EI)	
1. Définition.....	15
2. Historique.....	15

3. Épidémiologie.....	17
4. Physiopathologie.....	19
5. Tableau clinique.....	21
6. Diagnostic.....	24
6.1 Diagnostic de laboratoire.....	24
6.1.1 Virologie.....	24
6.1.2 Biologie moléculaire.....	30
6.1.3 Sérologie.....	31
6.2 Diagnostic différentiel.....	34
7. Traitement.....	34
8. Prophylaxie.....	36
8.1 Prophylaxie sanitaire.....	36
8.2 Prophylaxie médicale : Vaccination.....	36
8.2.1 Vaccins inertes.....	37
8.2.2 Vaccins vivants.....	39
8.2.3 Protocole.....	40

Partie expérimentale

Chapitre I : Matériels et méthodes

I. Matériels.....	42
I.1 Lieux d'étude.....	42
I.1.1 La Jumenterie de Chaouchaoua et son club équestre.....	42
I.1.2 L'annexe de l'ONDEEC.....	42
I.1.3 Les Champs de course de Barika, d'El-Eulma et Tiaret.....	42
I.2 Les animaux	43

II.	Méthodes.....	43
	II.1 Les prélèvements sanguins.....	43
	II.2 Les écouvillons naso-pharyngés (ENP).....	44
	II.3 Analyses.....	44
	II.3.1 Analyses sérologiques.....	44
	A. La technique ELISA.....	44
	A.1 Le coffret Flu Detect™ BE (Synbiotics).....	44
	A.2 Le coffret ID Screen® Influenza A Antibody Competition (ID VET).....	50
	B. La technique d’Inhibition de l’hémagglutination	54
	II.3.2 Analyse statistique.....	60
	II.3.3 Analyses virologiques.....	60
	A. Traitement des ENP.....	60
	B. Isolement du virus.....	60
	B.1 Sur œufs embryonnés.....	60
	B.2 Sur cellules MDCK.....	64
	C. Extraction de l’ARN viral.....	66
	D. PCR en temps Réel (qRT-PCR).....	68
	E. Amplification du gène HA1.....	68
	F. Séquençage et analyse phylogénétique.....	69
	 Chapitre II : Résultats et discussion	
I.	Résultats.....	70
	I.1 Les résultats sérologiques.....	70
	I.1.1 Variation de la séroprévalence du virus grippal en fonction de la technique utilisée.....	71

I.1.2 Séroprévalence de la grippe équine en fonction de la région	72
I.1.3 Séroprévalence de la grippe équine en fonction de l'âge des chevaux.....	73
I.1.4 Séroprévalence de la grippe équine en fonction de la race des chevaux.....	73
I.1.5 Séroprévalence de la grippe équine en fonction du sexe des chevaux.....	74
I.2 Les résultats virologiques.....	75
I.2.1 Chronologie et description du foyer de grippe équine rencontré en 2011 en Algérie.....	75
I.2.2 Détection du virus et analyse génétique de l'isolat EIV (H3N8).....	76
II. Discussion.....	79
Conclusion	
Références bibliographiques	

Liste des abréviations

AcM :	Anticorps monoclonal
ADCC :	Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity Assays
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ADNc :	ADN complémentaire
AGDP :	Agar Gel Diffusion Precipitation
ANSES :	Agence Nationale Sécurité, Environnement et Santé (France)
ARN :	Acide Ribonucléique
ARNc :	ARN complémentaire
ARNm :	ARN messenger
ARNv :	ARN viral
C' :	Complement
CRBC :	Chicken Red Blood Cells
DFA :	Directigen Flu A
ECP :	Effet Cytopathogène
EHV :	Equine Herpes Virus
EI :	Equine Influenza
EIPH :	Hémorragie Pulmonaire Induite par l'Exercice
EIV :	Equine Influenza Virus
ELISA :	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ENP :	Écouvillon nasopharyngé
EOPS :	Exempts d'Organismes Pathogènes Spécifiés
FC :	Fixation du complément
GR :	Globules Rouges
HA :	Hémagglutinine

HAD :	Hémadsorption
HI :	Hemagglutination Inhibition
IF :	Immunofluorescence
Ig :	Immunoglobuline
IHA :	Inhibition de l'hémagglutination
ISCOMS :	Immune Stimulating complexes
LPE :	Laboratoire de Pathologie Équine
M1 :	Protéine de matrice
M2 :	Protéine du canal ionique
MDCK :	Madin Derby Canine Kidney
MEM :	Minimum Essential Medium
NA :	Neuraminidase
NEP :	Nuclear export protein
NP :	Nucléoprotéine
NP-ELISA :	Nucleoprotein-ELISA
NS1 :	Protéine non structurale 1
NLSs :	Signaux de la Localisation Nucléaire
NT :	Non testé
OIE :	Organisation Mondiale de la Santé Animale
ONDEEC :	Office National du Développement de l'Élevage Équin et Camelin
PA :	Protéine acide
PB1 :	Protéine basique 1
PB2 :	protéine basique 2
PBS :	Phosphate Buffered Saline Solution
PCR :	Polymerase Chain Reaction

PSAn :	Pur-sang Anglais
PSAr :	Pur-sang Arabe
qRT-PCR :	Quantitative RT-PCR
RAO :	Recurrent Airway Obstruction
RT-PCR :	Reverse Transcription-PCR
SCHPM :	Société des Courses Hippiques et du Pari Mutuel
SRH :	Single Radial Hemolysis
SVF :	Sérum de Veau Fœtal
Ts :	Thermosensible
vRNP :	Ribonucléoprotéine virale
VTM :	Viral Transport Medium

Liste des figures

Figure 1 : Réservoir des virus influenza A	2
Figure 2 : Représentation schématique du virus influenza A	4
Figure 3 : Schéma du cycle répliatif du virus influenza A	11
Figure 4 : Cheval infecté par un EIV représente un écoulement nasal muco-purulent	22
Figure 5 : Technique de prélèvement par écouvillon	25
Figure 6 : Écouvillon mis dans un milieu de transport (VTM)	26
Figure 7 : Le test Immuno-chromatographique Directigen Flu A® (DFA)	27
Figure 8 : Inoculation du virus avec une seringue à insuline sur un œuf embryonné	29
Figure 9 : Test de l'IHA montrant 6 échantillons de sérum avec des titres de 1/32 (S1, S2 et S3), 1/16 (S4) et < 1/8 (S5 et S6)	32
Figure 10 : Plaque de SRH montrant les zones claires de l'hémolyse autour de 9 puits des 16 échantillons de sérum et d'un échantillon de contrôle positif dans le puits 16 ...	33
Figure 11 : Contrôle du titre de la suspension virale diluée à 4HA	57
Figure 12 : Ajustement de la suspension virale à 4HA	58
Figure 13 : Nombre de sérums positifs retrouvés dans la population étudiée par IHA	70
Figure 14 : Nombre de sérums positifs retrouvés dans la population étudiée par ELISA	71
Figure 15: Carte d'Algérie, montrant les régions où se localise la majeure partie de la population équine (90%), et qui sont affectées par la grippe équine (en vert) durant les mois de Mai et Juillet 2011	76
Figure 16: Analyse phylogénétique de la séquence nucléotidique du gène HA des différents virus H3N8 isolés par rapport à l'isolat A/Equine/Tiaret/H3N8/2011	78

Liste des tableaux

Tableau 1 : Rôles biologiques des protéines codées par les 8 segments génomiques du virus influenza A	5
Tableau 2 : Composition et Conservation du coffret Flu DETECT™ BE (Synbiotics)	46
Tableau 3 : Les valeurs obtenues dans notre étude par le coffret Flu DETECT™ BE (Synbiotics)	50
Tableau 4 : Composition et Conservation du coffret ID Screen® Influenza A Antibody Competition (ID VET)	51
Tableau 5 : Les valeurs obtenues dans notre étude par le coffret ID Screen® Influenza A Antibody Competition (ID VET)	53
Tableau 6 : Matériels et solutions nécessaires pour la technique IHA	54
Tableau 7 : Composition de la Solution PBS	55
Tableau 8 : Concentrations finales lors du passage P1 des échantillons à analyser	62
Tableau 9 : Concentrations finales lors des passages supplémentaires des échantillons à analyser	62
Tableau 10 : Titres d'anticorps obtenus par la technique IHA en fonction de la souche du VIE utilisée	71
Tableau 11 : Comparaison des séroprévalences du virus grippal chez le cheval en fonction de la technique utilisée ((IHA) du sous-type Russie/1983 (H3N8) versus ELISA Flu Detect et ELISA ID Screen)	72
Tableau 12 : Séroprévalence de la grippe équine détectée par ELISA ou par IHA dans les différentes régions algériennes incluses dans cette étude.....	73
Tableau 13 : Séroprévalence de la grippe équine détectée par ELISA ou par IHA en fonction de l'âge des chevaux	73
Tableau 14 : Séroprévalence de la grippe équine détectée par ELISA ou par IHA en	

fonction de la race des chevaux 74

Tableau 15 : Séroprévalence de la grippe équine détectée par ELISA ou par IHA en

fonction de la région, de la race et du sexe des chevaux 75

Tableau 16 : Origine des échantillons infectés par l'EIV 77

Introduction

Les affections respiratoires équine constituent le deuxième motif de consultation vétérinaire. La forte prévalence de la grippe équine et les contre-performances qu'elle occasionne, rendent nécessaire le dépistage de cette maladie et la mise en œuvre de tous les moyens de prévention existants.

Le virus influenza équin, plus communément appelé virus de la grippe équine, appartient à la famille des *Orthomyxoviridae*, genre *Influenzavirus*, type A. C'est l'un des principaux agents pathogènes responsables de maladies respiratoires du cheval. Deux sous-types distincts H7N7 et H3N8 sont connus comme agents infectieux des équidés (Sovinova et al., 1958; Waddell et al., 1963). Le sous-type H7N7 ne semble plus circuler à ce jour, la dernière épizootie datant de la fin des années 70 (Webster, 1993 ; Damiani et al., 2008; Bryant et al., 2009; Rozek et al., 2009) et des foyers sporadiques ont été retrouvés à la fin des années 80 en Inde (Singh, 1994) et en Égypte (Ismail et al., 1990). Depuis une vingtaine d'années, seul le sous-type H3N8 a été isolé à partir d'équidés malades (Daly et al., 2004; Newton et al., 2006; Callinan, 2008; Ito et al., 2008; Virmani et al., 2010). Depuis la fin des années 80, différentes études phylogénétiques des virus influenza équins de sous-type H3N8 ont démontré l'existence de deux lignages distincts : un lignage Eurasien et un lignage Américain (Daly et al., 1996). Ce dernier est lui-même subdivisé en 3 clusters appelés cluster Argentin, Kentucky et Florida (Lai et al., 2001). Le cluster Florida est composé de deux Clades, le Clade 1 et le Clade 2, principaux responsables des épizooties actuelles (OIE, 2008a; Bryant et al., 2009 ; Bryant et al., 2011). Entre 2007 et 2010 des épizooties dues au sous-type H3N8 ont été rapportées au Japon, en Australie, en Mongolie, en Chine, en Inde et en Irlande respectivement (Yamanaka et al., 2008; Reeve-Johnson, 2007; Callinan, 2008; Wei et al., 2010; Qi et al., 2010; Virmani et al., 2010; Gildea et al., 2011).

La grippe équine est une maladie virale très contagieuse qui se transmet rapidement par voie respiratoire. Les équidés infectés par le virus de la grippe équine sont prédisposés à développer une infection bactérienne secondaire due à un dysfonctionnement du rôle de la barrière mucociliaire. Sur le plan économique, la grippe équine est considérée comme une des maladies ayant le plus d'impact sur l'industrie de la filière équine (Bonnie and Tim, 2004).

En 1971-72, l'Algérie a connu une épizootie de grippe équine, ou l'affection avait atteint un très grand nombre de chevaux dans la région frontalière algéro-marocaine et dans la région d'Alger (Benmansour et al., 1977a,b). Deux virus du sous-type H3N8 ont été isolés A/Equine/Alger/6/71 et A/Equine/Alger/1/72. Depuis cette date, aucune donnée sur la circulation du virus de la grippe équine en Algérie n'a été publiée.

En Algérie, la recherche et l'identification des différentes pathologies équines ne sont pas prises en charge. Il n'existe aucun programme national permettant de lutter contre la propagation du virus influenza équin (aucune vaccination n'étant réalisée actuellement en Algérie) et l'unique action des services vétérinaires se limite à la mise en œuvre d'un traitement symptomatique et à la gestion d'éventuelles infections bactériennes secondaires.

L'objectif de cette étude est d'étudier la séroprévalence de la grippe équine en Algérie afin d'obtenir une information objective sur la situation de la maladie dans ce pays, ainsi que la répartition des chevaux séropositifs dans les différentes régions du pays en fonction de l'âge, du sexe et de la race des animaux. De plus, ce travail a pour but la mise en évidence et la caractérisation moléculaire du virus responsable de l'épizootie de grippe équine qui avait sévi en 2011 à Tiaret (ouest Algérien).

Partie bibliographique

Chapitre I : Le Virus Influenza Équin (EIV)

1. Importance

Les virus de la grippe sont rencontrés chez plusieurs espèces y compris les oiseaux, les êtres humains, les suidés, les chevaux et les chiens. Chez les mammifères auxquels ils sont adaptés, ces virus causent une pathologie respiratoire avec une morbidité élevée et une mortalité faible. De plus, des cas sévères de grippe peuvent se produire conjointement avec d'autres maladies ou avec des états d'affaiblissement, aussi bien chez les jeunes sujets que chez les âgés (Anna, 2007).

Chez le cheval, la grippe a un impact économique sur la filière équine avec des épizooties majeures qui interrompent les courses hippiques, les compétitions et les ventes... En effet, l'épizootie de grippe équine qui a sévi pour la première fois en Australie en 2007 a touché près de 75000 équidés et les pertes économiques directes et indirectes associées ont été estimées à près de 1 milliard de dollars. Le foyer signalé au Japon en 2007 affecta près de 2000 chevaux et représenta la première incursion du virus dans ce pays depuis 1971. Les foyers décrits en Mongolie et en Chine, affectèrent plus de 50000 chevaux. De nombreux foyers de faible envergure ont également été signalés en Europe et aux États-Unis d'Amérique (OIE, 2008b). En 2004, il a été mis en évidence, aux États-Unis, la présence de virus influenza de sous-type H3N8 chez des chiens de course (Crawford et al., 2005). Cette épizootie a été importante puisque, selon un suivi sérologique, 20000 chiens auraient été touchés, et 5 à 8% seraient morts suite à cette infection (Legrand et al., 2008a).

2. Classification

La classification des virus de la grippe est influencée généralement par le besoin pratique, pour l'estimation du risque représenté par l'apparition de nouveaux variants du virus (Frederick et al., 2008). Le virus de la grippe équine, appartient à la famille des *Orthomyxoviridae* (Mumford, 1992 ; Van Maanen et Cullinane, 2002 ; Bonnie et Tim, 2004),

genre *Influenzavirus*, type A (OIE, 2005). Le nom de la famille est dérivé du grec *myxa*, signifiant mucus et *orthos*, signifiant exact (Zientara, 2001). Les virus influenza de type A sont classés selon l'antigénicité de leurs molécules HA (hémagglutinine) et NA (neuraminidase), lesquels sont importants pour la virulence, l'immunité protectrice et la classification du virus. A l'heure actuelle, seize sous-types d'hémagglutinine (H1 à H16) et neuf sous types de neuraminidase (N1 à N9) ont été identifiés parmi les virus influenza de type A (Beard, 1998 ; Olsen et al., 2002 ; Fouchier et al., 2005 ; OIE, 2006 ; CDC, 2007). Tous ces sous-types ont été isolés chez les oiseaux aquatiques qui sont considérés comme un réservoir naturel pour les virus de la grippe de type A (Webster et al., 1992 ; Daly et Mumford, 2001) (fig. 1).

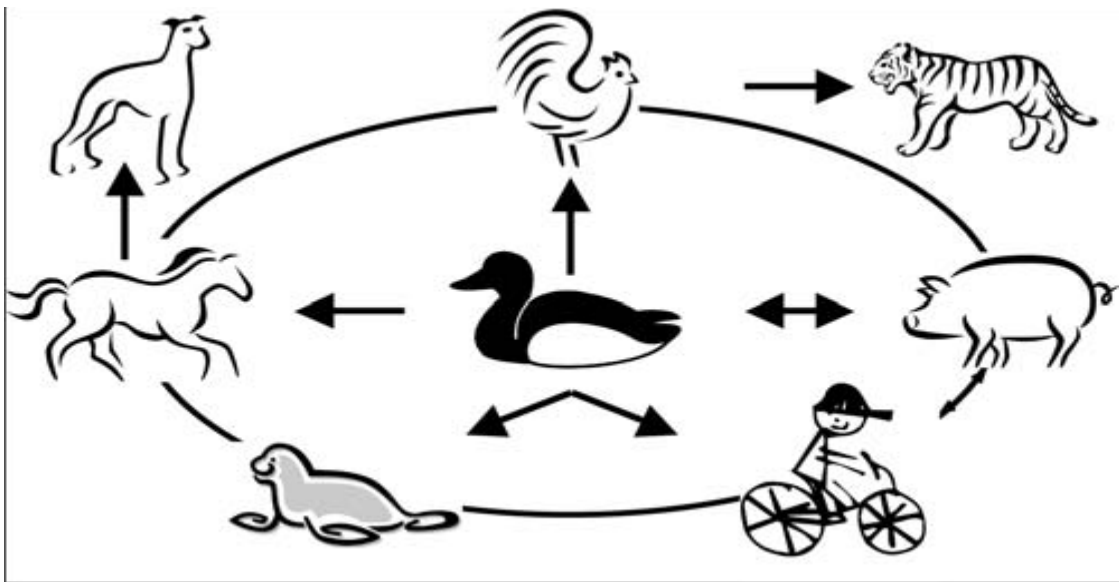
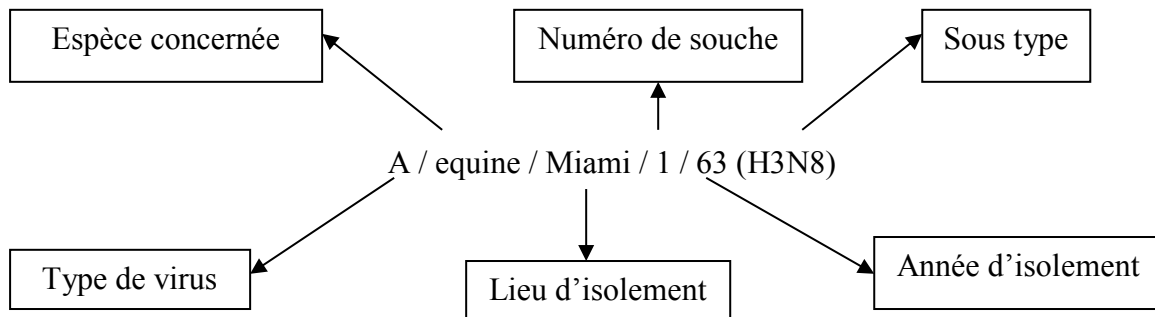


Figure 1: Réservoir des virus influenza A (Landolt, 2006).

Toutefois, les virus influenza infectant les mammifères sont limités à quelques sous-types seulement (Horimoto et Kawaoka, 2001). Deux sous-types sont connus, pour causer des maladies chez les équidés (H7N7 ou equi-1 et H3N8 ou equi-2). En effet, 2 sérotypes seuls d'hémagglutinine (H3 et H7) (Webster et al., 1992) et aussi de neuraminidase (N7 et N8) (Manuguerra, 1999) à avoir été retrouvés chez le cheval. Dans chaque cas, il n'y a aucune réaction immunologique croisée (Timoney, 1996). La nomenclature établie pour répertorier le

virus de la grippe dans les banques de données se base sur ces deux protéines et est faite de la manière suivante : (Type/Espèce hôte du virus/Lieu de l'isolement/Nombre de cas/Année de l'isolement (HxNx)) (Carter et Wise, 2006), exemple : Influenza A virus (A/Equine/Algiers/1/72 (H3N8)). Une souche sera notée ainsi (Wilson, 1993) :



3. Structure générale de l'EIV:

Le virus de la grippe (fig. 2) contient un génome formé d'ARN segmenté constitué de 8 fragments (Tableau 1) linéaires, simples brins de polarité négative, avec une nucléocapside à symétrie hélicoïdale (Zientara et Dauphin, 2003 ; Etienne, 2006 ; Bouvier et Palese, 2008). Six de ces segments codent des protéines uniques hémagglutinine (HA), neuraminidase (NA), nucléoprotéine (NP), et 3 sous-unités de la polymérase virale (PA, PB1 et PB2). Un segment code les protéines de matrice 1 et 2 (M1 et M2) et un segment code la protéine non-structurale 1 (NS1) et la protéine d'export nucléaire (NEP : nuclear export protein) (Wilson, 1993 ; Studdert, 1996). Les virions des Orthomyxovirus sont polymorphes, souvent sphériques ou légèrement étirés, d'une manière prédominante filamenteuse dans les isolats frais, de 80 à 120 nm de diamètre (Webster et al., 1992 ; Frederick et al., 2008) et les filaments formés souvent en excès de 300 nm de longueur (Peter et Shaw, 2007).

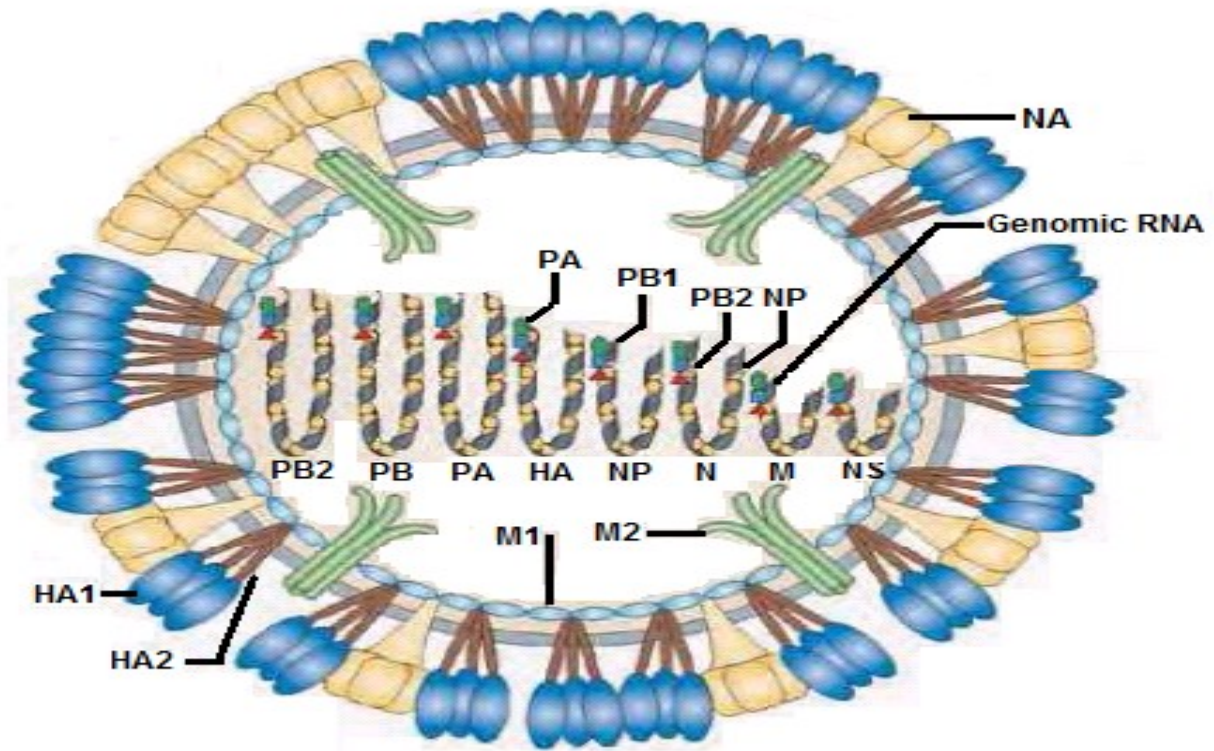


Figure 2 : Représentation schématique du virus influenza A

(D'après Karlsson Hedestam et al., 2008)

Le virus est enveloppé par une membrane lipidique à deux feuillets contenant les glycoprotéines de surface majeures, l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA) (Minke et Bublot, 2004). L'enveloppe est soutenue par des protéines de matrice adhérentes (M1 et M2) et elle entoure la nucléocapside qui est constituée des segments d'ARN enfermés chacun dans une structure en hélice composée de protéine NP. Les protéines PB1, PB2 et PA, qui forment le complexe ARN polymérase dépendante de l'ARN, sont associées à la nucléocapside. Les ARN viraux (vRNAs) associés aux molécules NP et à la polymérase forment les ribonucléoprotéines virales (vRNPs) (Paillot, 2007).

Segment génomique	Protéine codée	Rôle(s) biologique(s)
1	PB2	Sous unité de la polymérase, activité d'addition de la coiffe et d'endonucléase
2	PB1	Sous unité catalytique de la polymérase
3	PA	Sous unité de la polymérase active pour la synthèse de l'ARN viral
4	HA	Hémagglutinine : attachement au récepteur cellulaire et fusion membranaire
5	NP	Nucléocapside : liaison à l'ARN viral pour constituer le complexe ribonucléoprotéique (RNP)
6	NA	Neuraminidase : hydrolyse du récepteur lors du bourgeonnement de la particule virale
7	M1	Protéine de la matrice
	M2	Canal à ions
8	NS1	Protéine non structurale 1 : inhibitrice de la réponse en interféron
	NS2	Protéine non structurale 2 : exportation extranucléaire des complexes RNP

Tableau 1: Rôles biologiques des protéines codées par les 8 segments génomiques du virus influenza A (D'après Sebbag, 1998).

4. Les glycoprotéines d'enveloppes

4.1. L'hémagglutinine (HA)

L'hémagglutinine est la glycoprotéine de surface la plus abondante du virus, elle représente 35% des protéines totales (Wilson, 1993). Elle possède une structure tridimensionnelle (Wilson et al., 1981). C'est un trimère de protéines identiques où chaque monomère possède un corps fibrillaire et un domaine globulaire ; ces derniers sont associés en une « tête » et très proches les uns des autres (White, 1992). Son poids total est de 220kDa et sa taille est comprise entre 8 et 10 nm ; elle est synthétisée sous la forme d'un polypeptide précurseur (HA0) d'environ 550 acides aminés, comprenant un peptide signal de 16 acides aminés qui assure la translocation de la protéine dans le réticulum endoplasmique (Wiley et Skehel, 1987). L'hémagglutinine est responsable de la liaison du virus au récepteur cellulaire (acide neuraminique, acide sialique). Le blocage de cette protéine par les anticorps, prévient

l'attachement du virus aux cellules sensibles; donc elle est très importante dans l'immunité protectrice à médiation par les anticorps neutralisants (Carter et Wise, 2006).

4.2. La neuraminidase (NA)

La neuraminidase est une protéine d'enveloppe caractérisée par une activité enzymatique qui résulte en la liquéfaction du mucus, ce qui contribue à la propagation virale (Carter et Wise, 2006). Elle représente 5% des protéines totales du virus (Wilson, 1993). Sa structure est tridimensionnelle (Colman, 1994). Elle est formée d'environ 470 acides aminés et a une forme de champignon avec une région globulaire. C'est un homotétramère, lui aussi glycosylé, inséré dans la membrane par une séquence hydrophobe unique de 29 acides aminés près de son extrémité N-terminale. C'est dans chaque sous-unité de la partie globulaire que se trouve le site actif de l'enzyme et les sites antigéniques de neutralisation (Colman, 1994). La neuraminidase joue un rôle clé dans la libération de la progéniture du virus de la cellule hôte et elle est visée dans les recherches thérapeutiques de l'antivirus (Christine et David Wilson, 2006). Son rôle exact n'est pas encore totalement connu, elle interviendrait également dans l'assemblage et la maturation du virion, elle favoriserait la fusion des membranes virales et cellulaires lors de la phase de pénétration dans la cellule (Tissier, 2008).

5. Mode d'évolution des protéines HA et NA de l'EIV

Le virus de la grippe évolue perpétuellement avec l'apparition de nouveaux variants. Les modifications des deux protéines de surface se font soit par mutation ponctuelle appelée glissement antigénique « *drift* » (Fenner et al., 1987), soit par un changement majeur d'une partie entière du génome du virus « *shift* » (Studdert, 1996).

Le glissement antigénique relève de mutations ponctuelles sur les gènes codant les protéines HA et NA. Ceci ne concerne que quelques acides aminés constituant la protéine (Saito et al., 1993). Ces mutations auront plus d'importance si elles sont situées au niveau des sites antigéniques, c'est-à-dire les parties des protéines exposées et donc soumises aux

défenses de l'organisme infecté (anticorps...). Un tel évènement peut avoir plusieurs conséquences. Une mutation peut induire une diminution de la reconnaissance du virus par le système immunitaire de l'hôte et donc favoriser sa propagation. Elle peut aussi augmenter l'affinité de la protéine aux récepteurs des cellules, est donc favoriser l'infection de celles-ci par le virus. Mais ces mutations peuvent aussi être non significatives et ne rien changer au pouvoir infectieux du virus. Tous ces changements mineurs forment les différents variants à l'intérieur d'un sous-type et participent à l'évolution du virus (Legrand et al., 2008c).

Le changement majeur survient brutalement (Anna, 2007) et est la conséquence d'échanges de fragments génomiques entre souches d'origine animale variée à l'occasion d'infections mixtes au cours desquelles deux virus différents infecteraient la même cellule et échangeraient des segments d'acides nucléiques (Reid et Taubenberger, 2003). Ils portent sur l'hémagglutinine seule ou simultanément sur l'hémagglutinine et la neuraminidase (Zientara et Dauphin, 2003). Par exemple, si un virus de sous-type H3N8 infecte un individu de manière concomitante avec un virus H7N7, ceux-ci vont infecter des cellules de l'organisme, se multiplier, infecter une même cellule et vont pouvoir échanger des segments et donner naissance à une nouvelle souche virale qui pourrait être de sous-type H3N7 (Legrand et al., 2008c). Les modifications antigéniques majeures entraînent l'émergence de nouveaux sous-types du virus de la grippe qui sont, en général, responsables de vastes épidémies (Anna, 2007).

6. Cycle répliatif du virus influenza (fig. 3)

6.1. Activation du virus

Le virus, diffusé par aérosol, possède une hémagglutinine immature, il n'est pas infectieux. Dans les cellules cibles, l'hémagglutinine virale est activée par clivage en deux parties HA1 et HA2 en présence d'une protéase sérine (Bouvier et Palese, 2008), restent liées par des liaisons disulfides (Frederick et al., 2008). La portion HA2 sert comme médiateur de la fusion

d'enveloppe du virus avec les membranes cellulaires, alors que la portion HA1 contient le récepteur liant et aux sites antigéniques (Steinhauer, 1999).

6.2. Fixation et endocytose

Les virions s'attachent aux cellules par adsorption de leur hémagglutinine activée aux récepteurs de l'acide sialique sur la membrane plasmique (Frederick et al., 2008). L'adsorption virale sur la cellule permet l'endocytose du virus et donc la pénétration de celui-ci dans la cellule sous la forme d'un endosome (Carr et Kim, 1993). L'acidité du compartiment endosomal est cruciale pour les virus influenza non enveloppés (Bouvier et Palese, 2008). Une baisse du pH va permettre une modification de la structure de l'hémagglutinine (Stegmann, 2000 ; Sieczkarski et Whittaker, 2005) et lui donner une structure amphiphile menant à la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire (Carr et Kim, 1993).

6.3. Libération des segments ribonucléoprotéiques

Le contenu du virion subit lui aussi un changement de conformation facilitant le détachement des ribonucléoprotéines par rapport à la protéine M1 (Martin et Helenius, 1991). L'acidité va permettre aussi aux ions hydrogènes de l'endosome d'être pompés dans la particule du virus par le canal ionique M2. La protéine M2, est un canal ionique trans-membranaire trouvé seulement dans le virus de la grippe A, a des portions externes dans l'enveloppe virale, avec HA et NA (Pinto et al., 1992 ; Wharton et al., 1994). L'acidification interne du virion par le canal M2 interrompt les interactions internes protéine-protéine, en permettant aux complexes ribonucléoprotéiques (RNPs) viraux d'être détachés de la matrice virale et d'entrer dans le cytoplasme cellulaire (Martin et Helenius, 1991).

6.4. Transcription et réplication du génome viral

Une fois libéré du virion, les RNPs sont véhiculés au noyau de la cellule hôte par les protéines virales " Signaux de la Localisation Nucléaire " (NLSs), lesquelles sont des protéines

cellulaires directes, importent les RNPs et les autres protéines virales dans le noyau de la cellule hôte (Cros et Palese, 2003).

L'ARN viral dépendant de l'ARN polymérase, utilise l'ARNv- de polarité négative comme un gabarit pour synthétiser deux espèces d'ARN de polarité positive : gabarit de l'ARNm pour la synthèse de la protéine virale, et l'ARN complémentaire (ARNc) par lequel l'ARN polymérase transcrit par la suite plus de copies de polarité négative, du génome de l'ARNv. Le casque de l'ARN messenger se produit dans une façon unique de la même manière que les protéines PB1 et PB2 “steal” casques d'amorces de transcriptions du pré ARNm de l'hôte pour commencer la synthèse du ARNm viral; Ce processus est appelé “ cap snatching ” (Krug, 1981).

Les ARNm d'origine virale peuvent être exportés et traduits comme ARNm de l'hôte. Cependant, l'exportation nucléaire de segments de l'ARNv se fait par l'intermédiaire des protéines virales M1 et NEP/NS2 (Cros et Palese, 2003). M1 réagit réciproquement avec ARNv et NP, et réunit ces deux composants ensemble dans le complexe RNP; M1 s'associe aussi avec la protéine de l'exportation nucléaire NEP, lequel M1-RNP sert médiateur de l'exportation via les nucléopores dans le cytoplasme (Bouvier et Palese, 2008).

6.5. Traduction, transport et assemblage

Les protéines de l'enveloppe HA, NA et M2 sont synthétisées, à partir de l'ARNm d'origine virale, sur membrane bornée de ribosomes dans le réticulum endoplasmique où elles sont pliées et transportées à l'appareil de Golgi pour des modifications post-traductionnelle. Toutes les trois protéines ont des signaux apicaux assortis qui les dirigent par la suite à la membrane cellulaire pour s'assembler en virion. Bien que comparativement peu de connaissances au sujet de la traduction et assortissement des protéines non enveloppées soient disponibles, M1 pourrait jouer un rôle d'apporter le complexe RNP-NEP en contact avec l'enveloppe - bornée

HA, NA, et protéines M2 pour l'assembler à la membrane cellulaire de l'hôte (Palese et Shaw, 2007).

6.6. Encapsidation et bourgeonnement

Le virus de la grippe n'est pas complètement infectieux à moins que ses virions contiennent un génome plein de huit segments. Précédemment, l'ARNv assemblé était peut être un processus tout à fait aléatoire, dans lequel les segments de l'ARNv sont incorporés à l'aveuglette dans des particules en bourgeonnement du virus, et seulement se termine avec un génome complet devient infectieux. Cependant, la plus nouvelle évidence suggère que cet assemblage est un processus plus sélectif du quel les signaux de l'assemblage discrets sur tous les segments de l'ARNv s'assurent qu'un génome plein est incorporé la majorité des particules du virus (Bancroft et Parslow, 2002 ; Fujii et al., 2003).

Le bourgeonnement du virus de la grippe se produit à la membrane cellulaire, probablement commencé par une accumulation de la protéine matrice M1 à côté de la bicouche lipidique du cytoplasme. Le mode de contrôle pour l'inclusion des 8 fragments génomiques est encore inconnu (Studdert, 1996). Il semble que celui-ci soit aléatoire permettant de nombreuses combinaisons. Toutefois, des études récentes montrent qu'il existe un signal sur les 21 nucléotides situés en 3' de la région codant pour la neuraminidase, indispensable à son incorporation. De plus, il existe un modèle selon lequel les ARN viraux seraient associés par un appariement de bases au niveau de séquences spécifiques permettant l'encapsidation de l'ensemble (Fujii et al., 2003).

Quand le bourgeonnement est complet, les pointes HA, continuent à lier les virions à l'acide sialique sur la surface cellulaire jusqu'à ce que les particules du virus soient libérées par l'activité sialidase de la protéine NA (Bouvier et Palese, 2008). Dans les virus avec NA inactif ou absent, ou dans la présence d'inhibiteurs de neuraminidase, les particules du virus se regroupent à la surface cellulaire et par conséquent l'infectivité est réduite. La NA enlève aussi

les résidus de l'acide sialique de l'enveloppe du virus elle-même qui prévient l'agrégation de la particule virale pour rehausser l'infectivité (Palese et al., 1974 ; Palese et Compans, 1976).

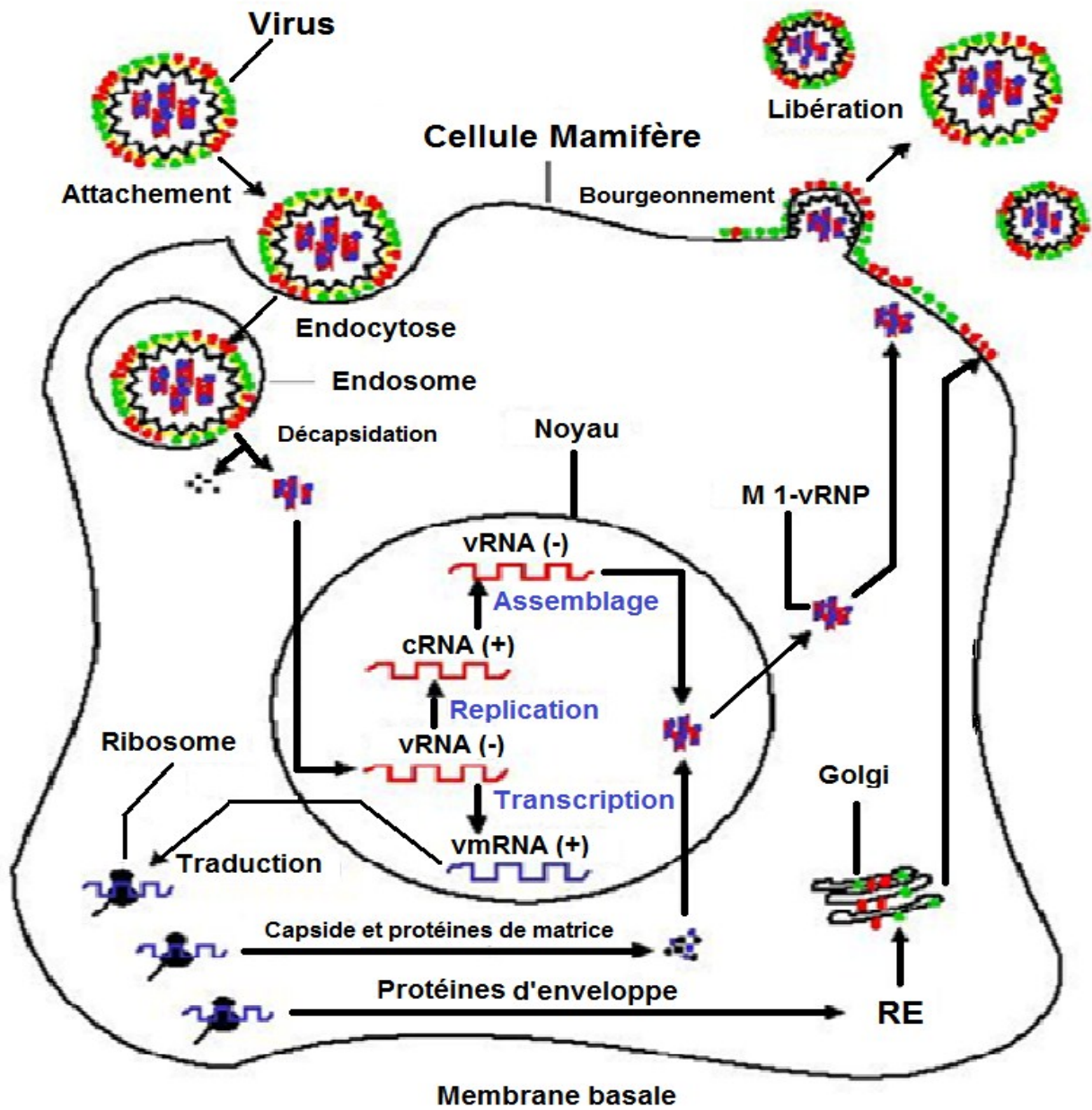


Figure 3 : Schéma du cycle réplcatif du virus influenza A (D'après Vester et Genzel, 2005)

7. Immunité et EIV

7.1 Immunité innée

La réponse immunitaire innée est la première ligne de défense de l'organisme. Elle est importante pour limiter la diffusion du virus au cours des premières heures qui suivent l'infection (Pronost, 2010).

L'infection des cellules épithéliales par le virus EIV stimule très probablement une réponse immunitaire innée chez le cheval, comme celle qui est décrite chez l'homme après infection par un virus influenza (Tamura et Kurata, 2004). Toutefois, cette réponse n'a pas été étudiée de manière approfondie chez cette espèce. L'infection par EIV a été associée à la synthèse au niveau local d'IL-6 et d'IFN, probablement des IFN de type I (i.e. IFNa/b) (Wattrang et al., 2003). L'IL-6 interagit de manière diverse avec les lymphocytes T et B et se trouve impliquée dans le développement d'une réponse humorale mucoale à base d'anticorps d'isotype IgA (Ramsay et al., 1994).

7.2. Immunité adaptive

La réponse immunitaire adaptive ou spécifique apparaît après la réponse innée, elle est spécifique du pathogène et induit une réponse mémoire qui persiste et peut être réactivée dans le cas d'un contact ultérieur avec ce pathogène. La réponse est généralement divisée entre la réponse des anticorps humoraux et la réponse à médiation cellulaire, qui impliquent les lymphocytes B et T, respectivement (Pronost, 2010), protègent contre l'infection par le virus EIV (Slater et Hannant, 2000).

L'infection naturelle par le virus EIV confère une immunité de longue durée qui protège l'animal contre une réinfection par le même type de virus en réduisant les signes cliniques et l'excrétion virale. La protection complète contre ces signes de la maladie peut persister jusqu'à 32 semaines après l'infection naturelle, une protection partielle est encore observée un an après (Hannant et al., 1987). L'immunité conférée par une infection surmontée, n'est pas

dépendante des anticorps circulants anti-HA, contrairement à l'immunité post-vaccinale. La réponse à médiation cellulaire et l'immunité muqueuse à IgA et IgG sécrétées jouent donc un rôle important dans la protection contre l'infection par le virus influenza A équin (Etienne, 2006).

Les molécules HA et NA sont les principales cibles de la réponse immunitaire humorale spécifique du virus influenza. Chez des poneys naïfs, l'infection expérimentale par le virus EIV induit un taux élevé d'anticorps sériques d'isotype IgM (Hannant et al., 1987), des anticorps d'isotype IgA, des IgGa et IgGb dans le sérum et les sécrétions nasales (Nelson et al., 1998). Chez les mammifères, les anticorps IgA au niveau des sécrétions nasales pourraient avoir un rôle important dans l'arrêt de la réplication du virus influenza au niveau des cellules infectées, pour prévenir l'excrétion virale induite par l'infection et pour la protection dite croisée contre des virus influenza antigéniquement différents (Tamura et al., 1991; Mazanec et al., 1995). Chez le poulain, les IgA peuvent être induites localement au niveau de la muqueuse ou être transportées du sérum aux sécrétions nasales dans le cas des IgA dimériques (Galan et al., 1986). Chez l'adulte, les anticorps IgA spécifiques sériques et mucosales (nasopharynx et trachée) augmentent au cours de la seconde semaine suivant l'infection par EIV puis disparaissent rapidement. La réponse secondaire des IgA sériques est plus rapide et persistante que leur réponse primaire (Hannant et al., 1987; Nelson et al., 1998). Le taux d'anticorps fixant le complément (FC) par hémolyse radiale simple augmente également de manière significative dans le sérum 7 jours après l'infection primaire des poneys. Toutefois, la réponse des anticorps décroît rapidement, et la majorité des chevaux sont séronégatifs pour ces anticorps après 62 semaines post infection. Les anticorps d'isotypes IgGa et IgGb augmentent également 7 jours post infection par EIV mais déclinent lentement sur une période de 15 mois (Hannant et al., 1987). Les anticorps d'isotypes IgGa et IgGb sont impliqués dans le mécanisme de fixation du complément et d'ADCC (Antibody Dependent

Cellular Cytotoxicity Assays) *in vitro* (McGuire et Crawford, 1973; Fujimiya et al., 1979), mais leur fonction effectrice *in vivo* n'a pas été déterminée.

De petites modifications antigéniques au niveau des épitopes des molécules HA et NA (dérive antigénique) permettent au virus d'échapper à la réponse immunitaire protectrice humorale (Daly et al., 2003). Chez le cheval, les anticorps ne confèrent pas de protection croisée entre les virus influenza de sous-type H7N7 et H3N8 (Wilson, 1993). L'infection par un virus influenza induit une immunité de longue durée indépendante des anticorps circulants spécifiques de la molécule HA (Paillot, 2007).

Chapitre II : La Grippe Équine (EI)

1. Définition

Le mot grippe viendrait, quant à lui, du mot allemand « greifen » qui signifie saisir (Tissier, 2008). Le mot « influenza » utilisé pour qualifier cette maladie semble provenir de l'expression italienne du latin « influenza » qui signifie influence, si utilisé car les épidémies peuvent être dues à des astrologies ou à d'autres influences surnaturelles (Frederick et al., 2008). La grippe équine est une maladie virale très contagieuse qui se transmet rapidement par voie respiratoire. Les équidés infectés par le virus de la grippe équine sont prédisposés à développer une infection bactérienne secondaire due à un dysfonctionnement du rôle de la barrière mucociliaire. Sur le plan économique, la grippe équine est considérée comme l'une des maladies ayant le plus d'impact sur l'industrie de la filière équine (Bonnie et Tim, 2004).

2. Historique

En 1956, la première manifestation rapportée du virus de la grippe équine s'est produite en Europe de l'Est et a été causée par la forme H7N7 (prototype A/équine/1/Prague/56), anciennement désignée par « sous-type 1 » ou « équi 1 » (Sovinova et al., 1958). Cette forme ne semble plus circuler à ce jour ou elle est présente à très bas niveaux dans quelques parties du monde, y compris l'Amérique du Nord, l'Europe (Rooney et Ames, 1996 ; Daly et Mumford, 2001 ; Kahn et Line, 2003) et l'Asie du centre (Acha et Szyfres, 2003), la dernière épizootie ayant été décrite en Italie en 1979 (Legrand et al., 2008a). Quelques cas sporadiques ont été retrouvés en Inde (Singh, 1994) et en Égypte (Ismail et al., 1990), vers la fin des années 80, et, au début des années 90. L'existence des anticorps dirigés contre ce sous-type dans des sérums de chevaux d'Europe Centrale et d'Asie, est une preuve d'une circulation à bas bruit encore persistante (Madic et al., 1996). Depuis, bien que des anticorps spécifiques aient été décelés chez des chevaux non-vaccinés au Maroc, en Tunisie et au Mali, aucun virus H7N7 n'a été isolé (Ellouze, 1980 ; Bousseta et al., 1994 ; Baazaoui, 1996 ; El Harrak et al., 1998 ; Sidibé et al., 2002).

En 1963, le sous-type H3N8 (prototype A/équine/2/Miami/63) anciennement désigné par « sous-type 2 » ou « équi 2 », a créé une épizootie de grippe équine à Miami (USA) (Wadell et al., 1963), par la suite il est devenu enzootique dans beaucoup de pays du monde (Bonnie et Tim, 2004). Depuis 1963, l'infection par le virus H3N8 a été rapportée chez les chevaux, les ânes et les mulets (Frederick et al., 2008) et avait créé les premières manifestations massives pendant 1964 et 1965 (Christine et David Wilson, 2006). En 1971-72, l'Algérie a connu une épizootie de grippe équine, où l'affection avait atteint un très grand nombre de chevaux (Benmansour et al., 1977a,b). Deux virus du sous-type H3N8 ont été isolés A/Equine/Alger/6/71 et A/Equine/Alger/1/72.

Toutefois, les virus H3N8 ont continué à circuler à ce jour (Webster, 1993 ; Damiani et al., 2008 ; Bryant et al., 2009 ; Rozek et al., 2009). L'isolement de ce sous-type a été décrit pendant une épizootie de grippe équine au Maroc en 1997, en Égypte 2000 et 2008, au Nigeria 1991 et en Afrique du Sud 1986 et 2003 respectivement (Kaddissi et al., 1998 ; Abd El-Rahim et Hussain, 2004 ; <http://www.oie.int> ; Adeyefa et McCauley, 1994 ; Guthrie et al., 1999 ; Guthrie, 2006) révélant que le virus en circulation est le sous-type H3N8. Depuis une vingtaine d'années, seul le sous-type H3N8 a été isolé d'équidés malades (Daly et al., 2004 ; Newton et al., 2006 ; Callinan, 2008 ; Ito et al., 2008 ; Virmani et al., 2010).

Depuis les années 1980s, différentes études phylogénétiques des virus influenza équins de sous-type H3N8 ont démontré l'existence de deux lignages distincts, qui semblent avoir évolué indépendamment l'un de l'autre (Timoney, 1996) : un lignage Eurasien et un lignage Américain (Daly et al., 1996 ; Mumford, 1999). Ce dernier est lui-même subdivisé en 3 clusters appelés cluster Argentin, Kentucky et Florida (Lai et al., 2001). Le cluster Florida est composé de deux Clades, le Clade 1 et le Clade 2, principaux responsables des épizooties actuelles (OIE, 2008 ; Bryant et al., 2009 ; Bryant et al., 2011). L'étude réalisée par Bryant et al. en 2011, sur les virus isolés dans la période 2008-09, démontre que la majorité des EIVs

circulant en Europe appartiennent au sous-groupe Floridien Clades 1 et 2 tandis que ceux circulant en Amérique du Nord appartiennent au sous-groupe Floridien Clade 1.

Les virus responsables des épizooties actuelles en 2007 au Japon et en Australie, et en 2008 en Égypte sont apparentés aux virus appartenant au sous-lignage Floridien Clade 1 au sein du groupe Américain (Callinan, 2008 ; Yamanaka et al., 2008 ; <http://www.oie.int>). Les virus isolés en Mongolie 2008, en Chine 2007-08 et en Inde 2008-09 ont été classés en clade 2 du sous lignage Floridien (Qi et al., 2010 ; Virmani et al., 2010 ; Wei et al., 2010). Tous les virus isolés et caractérisés en Irlande entre 2007 et 2010 sont apparentés aux virus appartenant au sous-lignage Floridien Clades 1 et 2 (Gildea, 2011). Les virus isolés en 2010 en France et au Royaume-Uni correspondaient tous au clade 2. Ainsi, le virus isolé chez le cheval exporté de Belgique vers le Japon était également un virus de clade 2 (OIE, 2011).

3. Épidémiologie

L'infection par le virus influenza A équin est répandue presque dans toutes les populations de chevaux du monde (Rooney et Ames, 1996) à l'exception de la Nouvelle Zélande et l'Islande (Cowled et al., 2009 ; Kittelberger et al., 2011). L'infection a été introduite pour la première fois en Australie en 2007 (Reeve-johnson, 2007), pays qui, jusqu'alors, était totalement indemne de cette maladie.

La grippe est surtout une maladie saisonnière survenant sous une forme sub-clinique (Etienne, 2006) d'apparition brusque (affection explosive), sévit souvent par vagues successives, suivies de périodes de relative accalmie (Zientara et Dauphin, 2003). L'EIV, est très contagieux. Il se transmet par voie aérogène, par l'intermédiaire d'aérosols émis par la toux (Zientara, 2003). La toux est contaminante sur un rayon de 35 mètres et l'aérosol contaminant peut être transporté jusqu'à 8 km (Tissier, 2008). Le virus peut aussi être transporté par le personnel et les véhicules (Etienne, 2006). Le virus de la grippe est fragile et facile à éliminer par l'acidité (pH=3), la chaleur (56°C pendant 30 minutes), les solvants de

lipides et les détergents (Frederick et al., 2008). La morbidité peut être élevée à 100% dans les populations sensibles, alors que la mortalité est généralement faible (Christine et David Wilson, 2006 ; Anna, 2007). La gravité de la maladie dépend de l'état immunitaire du cheval, de la dose virale infectante, de la virulence de la souche virale (Mumford et al., 1988 ; Mumford et al., 1990) et de la voie d'inoculation (Etienne, 2006).

Le virus de la grippe équine est proche de celui de la grippe humaine, mais aucune transmission de la grippe du cheval à l'homme (ou inversement) n'a été observée. Ces virus présentent une forte capacité de se modifier génétiquement, d'où plusieurs sous types (Barrier et Grobois, 2006). L'ARN du virus de la grippe est très sensible à la mutation ; par conséquent, les virus de la grippe chez les autres espèces constituent un réservoir potentiel pour une nouvelle infection. Cela est particulièrement vrai pour le virus de la grippe aviaire.

Une nouvelle souche de grippe équine avait causé une épizootie en Chine en 1989 avec une morbidité totale de 80% et un taux de mortalité de 20% dans certains élevages. Le prototype du virus de cette épizootie (A/eq/Jilin/89) a été identifié comme étant plus proche des virus influenza aviaires de sous-type H3N8 que du virus influenza équin contemporain (Guo et al., 1992). Cette observation permet d'évoquer pour la première fois la possibilité de transmission d'un virus influenza aviaire au cheval. Cette souche ne s'est pas disséminée ou maintenue en Chine au-delà de 1990. Le virus responsable de l'épizootie de 1993-94 en Chine est un virus H3N8, apparenté aux virus isolés en Europe depuis 1991, et qui n'avait donc rien de commun avec A/eq/Jilin/89, qui était d'origine aviaire (Guo et al., 1995).

Le cheval est généralement considéré comme un cul-de sac épidémiologique pour les souches d'influenza de type A car il ne transmet pas ce virus à d'autres espèces. Cependant, en Janvier 2004, une équipe de chercheurs Américains aurait identifié le premier cas de grippe équine ayant sauté la barrière d'espèces et ayant causé la mort de 8 lévriers à Naples (Floride) (Wozniak, 2004 ; Crawford et al., 2005). Il y a aussi des rapports de la souche H3N8 qui

cause les premières manifestations de la maladie respiratoire chez les populations des chiens de meute et de lévriers Anglais en Angleterre (Newton et al., 2007 ; Daly et al., 2008). De plus le virus H3N8 a été détecté comme agent causal de la maladie respiratoire chez les populations de chiens de tout âge et race, durant l'épizootie de grippe équine en Australie en 2007 (Kirkland et al., 2010).

La propagation mondiale du virus de la grippe équine est associée à l'augmentation des mouvements de chevaux participant à des compétitions ou destinés à l'élevage ou à la vente, comme en témoignent les épizooties observées à Hong Kong en 1992, à Dubaï en 1995, en Afrique du Sud en 2003, au Japon et en Australie en 2007 respectivement (Powell et al., 1995 ; Wernery et al., 1998 ; Guthrie, 2006 ; Toulemonde et al., 2005; Yamanaka et al., 2008; Cowled et al., 2009).

Les épizooties sévères de grippe équine, apparaissent dans des populations de chevaux non vaccinés ou lorsqu'une nouvelle souche infecte une population vaccinée (Minke et Bublot, 2004). Ainsi l'introduction de chevaux vaccinés et infectés de manière sub-clinique dans une population sensible fut à l'origine de graves épizooties, en Afrique du Sud en 1986, en Inde en 1987, en Europe en 1989, en Croatie en 2004 et en Italie en 2005 respectivement (Guthrie et al., 1999 ; Uppal et Yadav, 1987 ; Livesay et al., 1993 ; Barbic et al., 2009 ; Martella et al., 2007). Bien que la vaccination réduise la gravité de la maladie, elle ne semble pas en mesure de contrôler la propagation du virus d'autant plus que celui-ci évolue par dérive antigénique.

4. Physiopathologie

Tout comme le virus influenza humain, l'EIV est hautement contagieux, il est contracté par inhalation de particules aérosols infectieuses. L'EIV infecte, et se réplique dans les cellules épithéliales ciliées du système respiratoire supérieur (cavités nasales, pharynx et larynx) et inférieur (trachée et poumons), entraînant la destruction de larges portions de

l'épithélium respiratoire dans les 4 à 6 jours suivant le début de l'infection (Daly et Mumford, 2001; Paillot, 2007). Le virus s'attache aux glycoprotéines et aux mucopolysaccharides du mucus, qui enveloppe la muqueuse respiratoire et devient lié dans cette couche du mucus et incapable d'infecter l'épithélium des cellules respiratoires. Si la dose infectante du virus est élevée, la neuraminidase virale abondante brise les couches de mucus, en autorisant l'accès du virus au-dessous de l'épithélium des cellules. Le virus s'attache à l'épithélium des cellules, lie la pointe de l'hémagglutinine aux récepteurs de l'acide N-acétylneuraminique de la cellule. Le virus entre dans la cellule par endocytose, par fusion et par phagosome de la membrane, et est libéré dans le cytoplasme cellulaire où il se réplique pour produire de nouveaux virions qui sont par la suite libérés dans le tractus respiratoire par bourgeonnement du virus de la cellule infectée (Beech, 1991).

La dissémination locale du virus dans le tractus respiratoire durant 1 à 3 jours, provoque la nécrose des cellules de l'épithélium respiratoire et détruit l'appareil ciliaire. La clearance muco-ciliaire est fortement perturbée (Etienne, 2006) et le taux de la clearance trachéale peut être réduit jusqu'à 32 jours après l'infection (Willoughby, 1992). Dans les cas graves, l'infection virale produit une forte inflammation, avec de la congestion, des infiltrations péribronchiques ou péribronchioliques de cellules mononuclées, de l'exsudation fluide riche en protéines de polymorphonucléaires neutrophiles et de macrophages dans les voies respiratoires et alvéolaires. La régénération de l'épithélium respiratoire peut durer au moins 3 semaines (Christine et David Wilson, 2006 ; Etienne, 2006).

La destruction de larges portions de l'épithélium respiratoire favorise les infections secondaires (Zientara et Dauphin, 2005). Des bactéries opportunistes peuvent infecter la muqueuse respiratoire et causer des complications telles que de la broncho-pneumonie, de la bronchite, de la bronchiolite et un risque accru de maladie pulmonaire obstructive chronique (Etienne, 2006). Une pneumonie virale primaire rapidement fatale se produit chez les jeunes

poulains suivie par une nécrose des bronchioles, la congestion des vaisseaux sanguins, l'infiltration de neutrophiles, un œdème inflammatoire, affaissement des alvéoles et la dégénérescence du myocarde. A long terme les complications peuvent inclure l'hémorragie pulmonaire induite par l'exercice (EIPH) et obstruction des voies respiratoires récurrentes (RAO) (Christine et David Wilson, 2006).

Une phase de virémie peut parfois être observée mais sans doute exclusivement au cours de la première infection (Zientara et Dauphin, 2005). Dans ce cas, le virus traverse la membrane basale et pénètre dans la circulation sanguine causant potentiellement une inflammation des muscles squelettiques et cardiaques (myosite et myocardite), signes d'encéphalite, et œdème des membres. Les jeunes chevaux, âgés, affaiblis et stressés semblent être exposés à un grand risque de virémie et ses conséquences (Christine et David Wilson, 2006). Durant cette phase, le virus peut être retrouvé dans le système nerveux et le liquide péricardique (Zientara et Dauphin, 2005).

5. Tableau clinique

La période d'infectiosité est de 14 jours (Wilson, 1993) et la période d'incubation est de 1 à 5 jours (Etienne, 2006). Le tableau clinique est très proche de celui observé chez l'homme (Zientara, 2003). Les signes cliniques initiaux, une tuméfaction transitoire des nœuds lymphatiques pharyngés (Etienne, 2006) précèdent une brutale hyperthermie (39,1 à 41,7°C), une léthargie et l'anorexie. Ces signes accompagnés, d'une toux caractéristique, sèche, dure, explosive, répétitive non productive, persistent entre 1 et 5 jours, en l'absence de complications. La toux est une caractéristique clinique prédominante, mais n'existe pas toujours. Lorsqu'elle existe, elle peut persister pendant 1 à 3 semaines ou la fréquence diminue avec la guérison du cheval (Christine et David Wilson, 2006). Le cheval présente une grande fatigue, des écoulements nasal (Van Maanen et Cullinane, 2002) et oculaire, de l'hyperémie de la muqueuse nasale et de la conjonctivite. D'autres signes cliniques peuvent

être observés, l'œdème des membres postérieurs, la raideur (Etienne, 2006), un épiphora, une myalgie, une tachypnée et/ou une dyspnée (Zientara, 2003), une congestion des muqueuses nasale et oculaires, des douleurs musculaires et articulaires (Gerber, 1969).

La guérison survient en 1 à 2 semaines, lorsque les chevaux sont maintenus au calme et au repos, en l'absence de tout stress (Etienne, 2006). En l'absence de complications majeures, il y a une amélioration en 5 à 7 jours et une guérison de l'épithélium respiratoire en 3 semaines (Coggins, 1979).

La mortalité est pratiquement nulle chez les chevaux adultes. En revanche, les poulains et les jeunes chevaux naïfs peuvent développer une pneumonie grave, à évolution rapide qui peut s'avérer fatale (Zientara, 2003). La fièvre prolongée au-delà de 5 jour et/ou le développement d'un jetage nasal muco-purulent, est évocateur d'une infection bactérienne secondaire (fig. 4).



Figure 4: Cheval infecté par un EIV représente un écoulement nasal muco-purulent

(Abd El-Rahim et Hussein, 2004)

L'exposition des chevaux à une infection virale sévère ou l'apparition d'une infection bactérienne secondaire peut montrer « nostril flare » narine gorgée d'un écoulement muco-

purulent, une augmentation des efforts respiratoires, des craquements et des sifflements à l'auscultation du thorax, l'anxiété et la réticence à se déplacer (Christine et David Wilson, 2006).

Des avortements non spécifiques ont été mis en évidence chez des juments gestantes suite à une hyperthermie prolongée (Hannant et Mumford, 1996). L'observation dans de rares cas, d'une atteinte neurologique caractérisée par une encéphalite probablement due à une réaction immunitaire chez des chevaux non vaccinés a été rapportée au Royaume Uni (Daly et al., 2006), ou myocardique et peut entraîner une tachycardie, des anomalies électrocardiographiques et des arythmies telles que la fibrillation auriculaire. Lors des myocardites les chevaux sont fébriles, déprimés, et intolérants de l'exercice, et dans les cas graves, peuvent développer une insuffisance valvulaire et une insuffisance cardiaque congestive (Adams, 1959 ; Gerber, 1969). La caractéristique clinique d'une entérite a été observée uniquement en 1989 en Chine lors d'une épizootie de grippe équine provoquée par la souche Jilin/1989 (Mumford, 1990). Les signes cliniques chez les animaux partiellement immunisés à la suite d'une vaccination ou d'une infection antérieure par le virus influenza A équin sont plus difficiles à reconnaître comme il peut y avoir peu ou pas de la toux ou de fièvre (Jaeschke et Lange, 1993 ; Newton et Mumford, 1995). L'infection peut être sub-clinique, et a été décrite particulièrement chez des chevaux vaccinés pendant 18 jours avant de provoquer des signes cliniques reconnaissables (Powell et al., 1995), mais ces animaux excrètent et ils sont souvent les premiers cas d'une épizootie importante (Etienne, 2006). Chez les chevaux de course vaccinés, seule une diminution des performances peut être due à une infection par le virus influenza A équin (Mumford, 1990).

6. Diagnostic

La grippe se propage d'une manière très rapide. Par conséquent, le vétérinaire doit agir le plus vite possible dès qu'on soupçonne une infection pour empêcher le déclenchement d'une épizootie. Un diagnostic rapide associé à l'isolement des chevaux touchés sont les lignes fronts de défense contre les épizooties. Ainsi, la reconnaissance des signes cliniques (fièvre, dépression, toux quinteuse et écoulement nasal) en conjonction avec une enquête prêle sur le potentiel vital de l'infection. Les caractéristiques importantes de l'enquête sont, le statut vaccinal, l'âge des chevaux touchés, les déplacements, les conditions d'élevage et les évènements récents (rencontres de nouveaux chevaux, la participation dans les courses ou dans les spectacles) (Christine et David Wilson, 2006). Un diagnostic présomptif de la grippe équine repose sur les signes cliniques, qui doivent être confirmés par l'isolement ou la détection du virus, ou par les tests sérologiques (Daly et Mumford, 2001).

6.1) Diagnostic de laboratoire

De nombreuses méthodes de diagnostic ont été décrites pour la détection du virus basées sur la virologie classique, l'immunologie ou la biologie moléculaire (Legrand et al., 2008a). Le diagnostic repose sur l'isolement du virus à partir de chevaux en phase de maladie respiratoire aiguë ou sur la mise en évidence d'une réponse sérologique à l'infection. Dans l'idéal les deux méthodes sont mises en œuvre. L'infection peut aussi être mise en évidence par la détection de l'antigène viral dans les sécrétions de l'appareil respiratoire à l'aide d'une méthode immuno-enzymatique (ELISA), ou par la détection du génome viral par une épreuve d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) (OIE, 2008a).

6.1.1) Virologie

Le diagnostic virologique est la méthode de choix. Le virus grippal équin est responsable d'une infection localisée et seule la recherche du virus au niveau des voies respiratoires permettra de la mettre en évidence (Zientara, 2003).

a. Les écouvillons nasopharyngés (ENP)

Les écouvillons nasopharyngés pour l'isolement ou la détection du virus doivent être collectés aussi rapidement que possible. Les résultats des études expérimentales suggèrent que les titres du pic viral sont obtenus au cours des premières 24 à 48 heures de fièvre, dans le deuxième ou le troisième jour après l'infection, et la durée de l'excrétion virale est généralement pas plus de 4 ou 5 jours (Mumford et al., 1990). Les échantillons des écouvillonnages nasopharyngés sont pris par passage d'un écouvillon aussi loin que possible dans le naso-pharynx du cheval via le méat ventral pour l'absorption des sécrétions respiratoires (fig. 5).

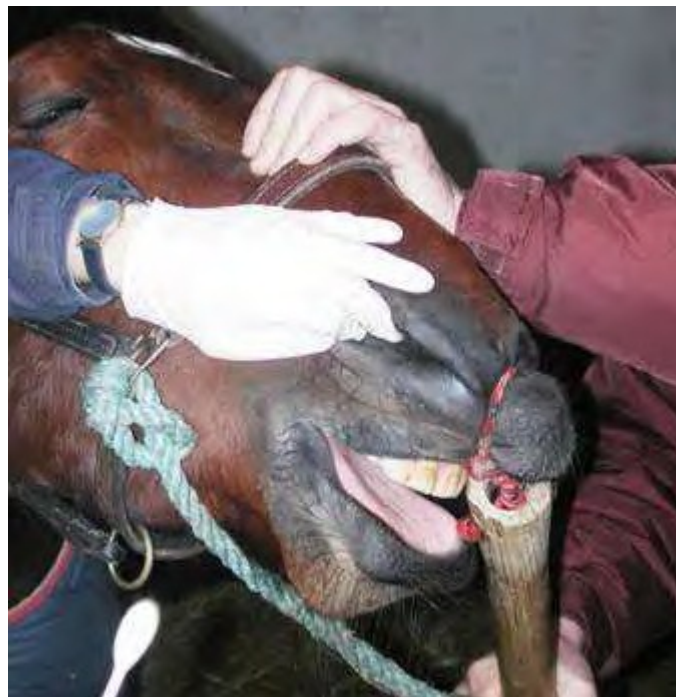


Figure 5: Technique de prélèvement par écouvillon nasopharyngé (Tissier, 2008).

Les écouvillons sont transférés immédiatement après usage dans un tube contenant du milieu de transport viral (VTM) (fig. 6) pour maintenir la viabilité du virus (Daly et Mumford, 2001).



Figure 6: Écouvillon mis dans un milieu de transport (VTM) (Tissier, 2008).

Si les échantillons doivent être inoculés dans les 1 à 2 jours qui suivent, ils peuvent être maintenus à 4 °C, mais s'ils sont gardés plus longtemps, ils doivent être conservés à -70 °C ou en dessous. Il est préférable par ailleurs que les prélèvements soient transportés sur glace (OIE, 2008a).

b. Les tests rapides

Aujourd'hui, une large gamme de tests de laboratoire sont disponibles qui permettent un diagnostic plus rapide et moins coûteux de la grippe en détectant la présence d'antigènes viraux (Cook et al., 1988), l'acide nucléique viral (Oxburgh et Hagstrom, 1999), ou des cellules infectées par des virus dans les sécrétions respiratoires. Pour ce faire, plusieurs méthodes sont réalisables comme :

- L'immunofluorescence (IF) (Anestad et Maagaard, 1990) qui présente l'avantage d'être légèrement plus sensible que la plupart des tests rapides commerciaux. Ce procédé est utilisé dans les hôpitaux pour le diagnostic chez l'homme mais moins pratiqué dans le cas du virus grippal équin (Pronost et al., 2008).
- La NP-ELISA (Nucleoprotein Enzyme-linked Immuno-sorbent Assay) (Cook et al., 1988; OIE, 2004b ; Bryant et al., 2009) utilisant un anticorps monoclonal (AcM) dirigé contre la nucléoprotéine (Cook et al., 1988 ; Livesay et al., 1993), employé chez

l'homme, est utilisé pour détecter en 20 à 30 minutes, les virus équins à partir d'écouvillons naso-pharyngés (Zientara et Dauphin, 2005).

- Les tests rapides immuno-chromatographiques tel que le test Directigen Flu A (DFA) (fig. 7), utilisé dans le diagnostic de la grippe humaine, commercialisé et peuvent être utilisés pour la détection de l'antigène du virus de la grippe équine directement dans les échantillons de prélèvement nasal et ne nécessite que 15 minutes pour obtenir un résultat (Chambers et al., 1994) et AGDP (Agar Gel Diffusion Precipitation) (AUSVETPLAN, Animal Health Australia, 2007).



Figure 7: Le test Immuno-chromatographique Directigen Flu A® (DFA) (Tissier, 2008).

L'utilisation de ces tests rapides s'avère plus simple que la technique d'isolement viral, les résultats sont plus rapides, et la lecture, plus aisée, requièrent moins de savoir-faire (Legrand et al., 2008a), peuvent rendre le processus d'isolement du virus beaucoup plus efficace en aidant le personnel de laboratoire dans leur choix des échantillons à partir desquels l'isolement du virus est le plus susceptible d'être couronné de succès (Daly et Mumford, 2001). Ce type de méthode directe de détection ne doit cependant pas être préféré à l'isolement du virus (OIE, 2008a).

c. Isolement du virus

L'isolement du virus est une méthode spécifique de diagnostic, mais n'est pas adapté pour la détection rapide car il peut prendre plusieurs passages (jusqu'à 5 passages successifs) et jours (chaque passage nécessite 3 à 4 jours) ou semaines pour être complété. Néanmoins, l'isolement du virus est un élément essentiel du dispositif de surveillance des dérives antigéniques et de l'émergence de nouveaux virus mais également pour fournir les isolats qui permettront la production de vaccins efficaces (Foord et al., 2009). L'isolement des souches de grippe se fait principalement par culture sur œuf embryonné de poule ou directement sur des cellules permissives comme les MDCK (Madin Derby Canine Kidney).

- **Sur œuf de poule embryonné :** Traditionnellement, pour le sous-type H3N8, les œufs sont préférés car la culture directe sur cellule présente un faible rendement (Legrand et al., 2008a) ainsi les virus cultivés sur les œufs sont plus susceptibles de ressembler au virus des échantillons cliniques (Ilobi et al., 1998). Le prélèvement est inoculé à l'embryon de poulet par voie amniotique ou par voie allantoïque aux œufs embryonnés de poule âgés 9 - 11 jours (fig. 8). Après incubation à 34-35 °C pendant 3 jours (OIE, 2008a), le virus est détecté et identifié au bout de quelques jours (Zientara et Dauphin, 2005) par l'activité hémagglutinante de son hémagglutinine. Un typage doit être effectué via des sérums polyclonaux spécifiques d'un sous-type qui inhibera alors cette activité (Legrand et al., 2008a). Il peut être nécessaire de réaliser jusqu'à 5 passages pour isoler le virus notamment à partir d'animaux vaccinés. Si aucun virus n'a été isolé au cinquième passage, il est peu probable d'en isoler à partir d'un nombre de passages supérieur.



Figure 8: Inoculation du virus avec une seringue à insuline a un œuf embryonné

(Tissier, 2008).

- **Sur culture cellulaire :** Des cultures de cellules MDCK (MDCK ATCC CCL34) peuvent être utilisées pour isoler le virus de la grippe équine. Les cellules sont multipliées en tube jusqu'à confluence puis chaque échantillon est inoculé. En cas de positivité ou dans tous les cas après 7 jours, les surnageants sont testés vis-à-vis de l'activité HA. Une autre façon de procéder est la mise en évidence d'un phénomène d'hémadsorption (HAD). Cette technique permet de détecter l'expression d'antigènes viraux à la surface des cellules (OIE, 2008a).

La comparaison des virus H3N8 isolés sur œufs ou sur cellules rénales canines (MDCK) montre que ces dernières peuvent sélectionner des variants viraux qui ne sont pas représentatifs du virus prédominant dans l'échantillon clinique (Ilobi et al., 1994). Cependant, au cours des dernières années quelques virus ont été isolés avec succès en cellules MDCK mais pas sur l'œuf et la sélection des variants s'est faite par culture sur œuf (Oxburgh et Klingeborn, 1999) ; les isolements peuvent par conséquent être réalisés sur l'un ou l'autre support.

6.1.2) Biologie Moléculaire : Réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR)

Des épreuves PCR sont de plus en plus utilisées dans la détection par la mise en évidence de la présence du génome du virus de la grippe équine dans les sécrétions nasales et pour les études d'épidémiologie moléculaire (Donofrio et al., 1994 ; Oxburgh et Hagstrom, 1999 ; Lai et al., 2001). Le virus de la grippe a cette particularité d'être en constante évolution, d'incorporer régulièrement des mutations au sein de son génome. Ainsi, est-il nécessaire de réaliser la RT-PCR dans une région très peu variable coïncidant généralement à une protéine peu exposée et donc peu soumise à la pression immunitaire de l'hôte. Un des gènes le plus communément ciblés est celui situé sur le segment 7 codant pour une protéine de structure, non située à la surface du virus, la protéine matricielle 1 (M1). La RT-PCR peut être effectuée de deux manières différentes, soit une RT-PCR dite « classique », avec une révélation sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium ou par hybridation spécifique, soit une qRT-PCR en temps réel dite quantitative, avec une analyse en direct de l'évolution des résultats. Avec cette dernière méthode, une quantification est réalisable via un plasmide pré-quantifié, permettant l'évaluation de la charge virale du prélèvement (Legrand et al., 2008a). La technique qRT-PCR s'est révélée plus sensible pour la détection d'échantillons positifs que l'isolement du virus sur œufs ou en culture cellulaire, la détection de l'antigène par DFA, la détection de la nucléoprotéine par ELISA ou la sérologie (Quinlivan et al., 2004, 2005; Legrand et al., 2008b; Foord et al., 2009; Lu et al., 2009). Même si la séquence génétique des isolats peut être obtenue par les tests PCR, il est, néanmoins, essentiel d'isoler les virus afin d'étudier les propriétés et les dérives antigéniques (OIE, 2008a). Cette technologie peut s'avérer utile dans les programmes de surveillance dans l'avenir quand des difficultés sont rencontrées avec l'isolement du virus.

6.1.3) Sérologie

Les infections peuvent être mises en évidence à l'aide d'épreuves sérologiques sur des sérums couplés montrant une élévation des titres d'anticorps. Le premier échantillon doit être recueilli aussitôt que possible après le début des signes cliniques (phase aiguë) et le second environ 2 semaines après (phase de convalescence). Il existe 2 méthodes simples, l'inhibition de l'hémagglutination (HI) et l'hémolyse radiale (SRH) toutes deux également efficaces et largement utilisées. La fixation du complément (FC) peut aussi être utilisée, mais n'est habituellement pas pratiquée. Les 2 sérums couplés doivent être testés en parallèle en même temps afin de diminuer la variabilité. Ces épreuves doivent être pratiquées qu'il y ait tentative ou non d'isolement de virus (OIE, 2008a), mais rarement utilisées dans la prise en charge clinique immédiate. Cependant, le diagnostic rétrospectif peut établir un diagnostic clinique en l'absence des techniques d'isolement viral ou de détection de l'antigène. En outre, la détection sérologique de l'infection par le virus influenza, reste un outil de surveillance très utile (Daly et Mumford, 2001 ; Christine et David Wilson, 2006).

- Le test d'inhibition de l'hémagglutination (HI)

Il mesure la capacité des anticorps spécifiques de la grippe équine présents dans les échantillons de sérums d'inhiber l'agglutination des globules rouges (GR) par l'antigène. Les sérums sont traités au préalable afin d'éliminer les hémagglutinines non spécifiques et inactivés à 56 °C pendant 30 min. L'épreuve est réalisée de préférence en micro plaques à l'aide d'un dispositif de dilution en série approprié avant l'incubation avec une dose standard de l'antigène (titre HA 1/4 par puits en microméthode). Une suspension de GR est ajoutée, et après une période d'incubation, on lit la plaque (Fig. 9).

Le titre HI est donné par la plus haute dilution du sérum inhibant complètement la réaction d'hémagglutination (Daly et Mumford, 2001 ; OIE, 2008a). Une

augmentation par quatre ou plus du titre observée sur 2 sérums couplés indique une infection récente (US Department of Health and Human Services, 1982 ; Wood et al., 1994). Un test ELISA qui détecte les anticorps contre l'hémagglutinine a été récemment décrit et peut être plus utile que le test HI (Sugiura et al., 2001).

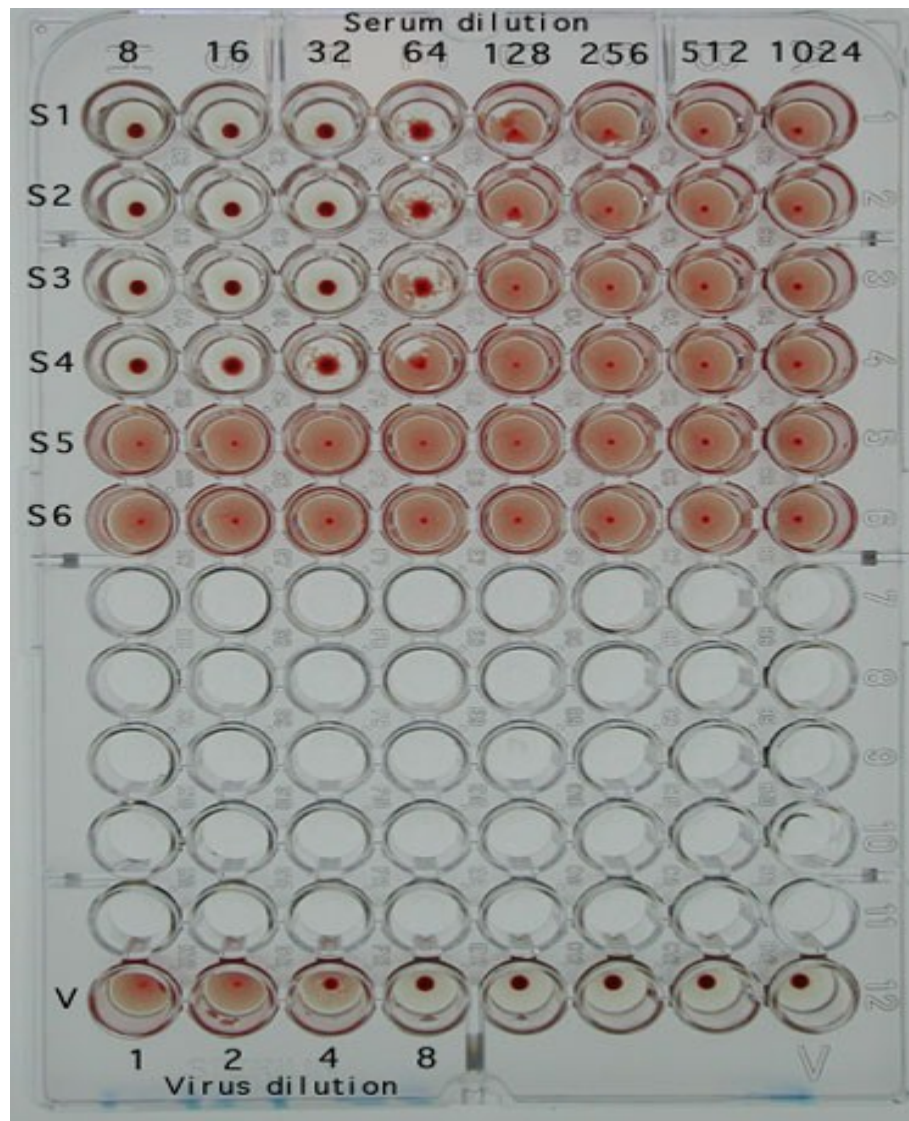


Figure 9: Test de l'IHA montrant 6 échantillons de sérum avec des titres de 1/32 (S1, S2 et S3), 1/16 (S4) et $< 1/8$ (S5 et S6) (Daly et Mumford, 2001).

- **Le test d'hémolyse radial simple (SRH)**

Bien que, il soit moins spécifique de souches, plus reproductible et présent moins, d'erreurs que le test IH et comme c'est un test linéaire il est plus sensible, permettant la détection de petites hausses en anticorps induits par l'infection chez les chevaux

fortement vaccinés (Livesay et al., 1993). Dans cette épreuve, l'antigène viral est fixé à des GR en suspension dans un gel d'agarose contenant du complément de cobaye (C'). Des puits sont percés dans le gel et remplis de sérums à tester. Les anticorps anti-grippe équine et le C' provoquent une lyse des GR couplés avec l'antigène et entraînent l'apparition d'une zone claire d'hémolyse autour du puits. La taille de cette zone est directement proportionnelle aux taux d'anticorps spécifiques présents dans le sérum à tester (Schild et al., 1975 ; Plateau et Cruciere, 1983 ; Morley et al., 1995) (Fig. 10).

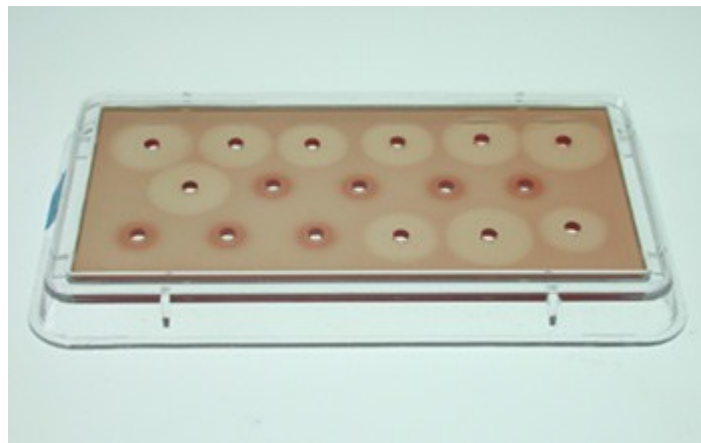


Figure 10: Plaquette de SRH montrant les zones claires de l'hémolyse autour de 9 puits des 16 échantillons de sérum et d'un échantillon de contrôle positif dans le puits 16 (D'après Daly et Mumford, 2001)

L'augmentation de surfaces (de 50% ou de 25 mm²) des zones d'hémolyse des sérums convalescents comparés avec la surface des sérums prélevés en phase aiguë est la preuve d'une infection (Wood et al., 1994). La surface peut être calculée à partir d'une courbe standard effectuée par dilutions successives d'un sérum de référence.

Cependant, il est difficile de distinguer par les deux tests (HI et SRH), les anticorps induits par une infection grippale de ceux induits par la vaccination. Un test ELISA permettant de détecter des anticorps dirigés contre la protéine non structurale NS1 du virus grippal, est en développement (Ozaki et al., 2001). Cette protéine (NS1) est produite lors d'une infection

virale et n'est pas présente dans les vaccins à virus inactivés, elle doit permettre de différencier les réponses humorales à une infection de celles à une vaccination avec ce type de vaccin (Birch-Machin et al., 1997).

6.2) Diagnostic différentiel

Le diagnostic différentiel repose surtout sur l'évolution de la maladie au sein de l'effectif. En effet, il est très difficile de différencier les manifestations cliniques initiales d'une infection à virus grippal de celles d'une infection à herpèsvirus 1 ou 4 par exemple (Zientara, 2003). Chez les animaux non vaccinés, la maladie est caractérisée par sa propagation rapide et par une toux sèche et profonde. La rapidité de la propagation de la grippe équine est une observation clé pour la différencier des autres maladies respiratoires infectieuses (Daly et Mumford, 2001), alors que la contagiosité des herpèsvirus est beaucoup plus faible que celle du virus grippal. Il en est de même pour le virus de l'artérite virale sous sa forme respiratoire. L'intensité des symptômes est plus modérée lors d'infections par d'autres virus des équidés à tropisme respiratoire (rhinovirus équin, adénovirus, réovirus...). Néanmoins, certaines souches de virus influenza peuvent, en particulier dans un contexte de large couverture vaccinale, induire parfois des formes cliniques atténuées (Powell et al., 1988 ; Powell, 1991 ; Zientara, 2003), ce qui rend le diagnostic de la grippe équine plus difficile en raison de la réduction de l'évidence clinique de la maladie (Daly et Mumford, 2001).

7. Traitement

Il n'existe pas vraiment de traitement réellement efficace pour lutter contre ce virus. Chez le cheval, le traitement instauré est essentiellement symptomatique. Un repos strict et une alimentation adaptée dans un environnement propre et correctement ventilé afin que les épithéliums respiratoires retrouvent leur intégrité physique et fonctionnelle (Powell, 1991) sont indiqués. Ce sont les premiers soins à apporter, avec une règle générale recommandant

une semaine de repos par jour de fièvre, suivie d'un retour progressif au travail (Chambers et al., 1995). Le non-respect de ces prescriptions simples est souvent à l'origine de complications ultérieures qui se manifestent par des cardiopathies ou des pathologies pulmonaires regroupées dans le complexe des maladies pulmonaires obstructives chroniques (Timoney, 1996 ; Zientara et Dauphin, 2005). La mise à disposition d'eau propre et fraîche ainsi que le foin doit être mouillé ou encore remplacé par un aliment appétant et riche en fibres sont recommandés. L'animal doit être couvert et installé confortablement à l'abri des courants d'air et de la poussière (Tissier, 2008). Des solutions d'électrolytes peuvent être distribuées et placées d'une manière facilement accessible aux chevaux fébriles et léthargiques. Des anti-inflammatoires non stéroïdiens peuvent être donnés pour faire baisser la fièvre et éviter le risque d'avortement chez les juments gestantes, mais ils doivent être administrés avec précaution chez les chevaux déshydratés et peuvent masquer parfois des complications. L'utilisation d'antibiotiques peut s'avérer intéressante notamment en cas de surinfection bactérienne. Il est recommandé d'utiliser la pénicilline G ou le triméthoprime (sulfamide) sur une période de 7 à 10 jours et s'étendant sur au moins 3 jours après la résolution des signes cliniques (Daly et Mumford, 2001 ; Christine et David Wilson, 2006). Dans une étude récente on a démontré que l'administration de la marbofloxacin, par aérosol serait efficace et permettrait d'obtenir de fortes concentrations dans le liquide broncho-alvéolaire (Art et al., 2005). Quelques composés antiviraux utilisés en médecine humaine peuvent être utilisés pour les chevaux de grande valeur, comme l'amantadine, la rimantidine, qui sont des inhibiteurs de la réplication virale agissant sur la protéine M2 et en bloquant les canaux ioniques (Scholtissek et Faulkner, 1979), ou l'oseltamivir et le zanamivir, qui sont des inhibiteurs de la neuraminidase empêchant le nouveau virus de quitter la cellule infectée (Yamanaka et al., 2006). Ces molécules sont coûteuses et apportent peu d'avantages chez un cheval déjà infecté. Elles sont utilisées à titre préventif dans un contexte épizootique.

8. Prophylaxie

8.1) Sanitaire

La séparation stricte et immédiate entre animaux indemnes et animaux infectés constitue la principale mesure qui puisse minimiser la propagation du virus. De plus, il faut repérer les chevaux sensibles et ceux susceptibles de transmettre l'affection (Daly et Mumford, 2001 ; Christine et David Wilson, 2006). Le respect des règles d'hygiène doit éviter la transmission de manière directe du virus de la grippe, et les mouvements du personnel sont à contrôler. La ventilation de l'écurie permet la diminution de la charge virale ; enfin, l'enveloppe du virus est faite de lipides, le rendant sensible aux détergents et désinfectants. Il est possible d'utiliser des ammoniums quaternaires, des phénols, du formol ou des dérivés phénicolés pour les locaux, le matériel de transport et de soin (Tissier, 2008).

8.2) Médicale : Vaccination

La prévention et le contrôle de la grippe dépendent étroitement des mesures de vaccination et de conduite de l'élevage. La vaccination est à ce jour le moyen le plus usuel pour limiter la propagation du virus au sein de la population équine. Les vaccins contre la grippe équine doivent contenir les sous-types et, à l'intérieur de ceux-ci, les variants antigéniques qui circulent dans la population équine. Chaque année, l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE) recommande les souches de virus influenza A équin que doivent contenir les vaccins. En l'absence de circulation de souches des sous-types H7N7 et H3N8 appartenant à la lignée eurasienne, les vaccins actuels doivent inclure les variants antigéniques des virus représentant chacun des clades 1 et 2 de la sous-lignée Florida (OIE, 2011). Les vaccins contre la grippe équine sont largement disponibles et sont utilisés en routine chez les chevaux de course et de compétition dans plusieurs pays du monde.

Historiquement, les vaccins contre EIV étaient composés principalement de virus complets inactivés conférant différents niveaux de protection contre la maladie. Les vaccins composés

de virus vivants atténués ou de vecteurs viraux de type poxvirus codant des protéines virales ont été développés et commercialisés pour le cheval. Les stratégies de vaccination peuvent être divisées entre l'administration de vaccins inertes ou vivants. D'autres approches, comme la construction par génétique inversée de virus vivants atténués, sont également en cours de développement (Paillot, 2007).

8.2.1) Les vaccins inertes

Les vaccins dits inertes contiennent du virus complet tué ou inactivé, des protéines sous-unitaires ou sont à base d'ADN recombinant.

a. *Vaccins à base de virus complets inactivés*

Les vaccins antigrippaux dits conventionnels ou à virus inactivés, contiennent des antigènes de surface (*split vaccines*) ou des virus complets (Etienne, 2006) pour une administration parentérale. Ils sont soit monovalents, soit combinés avec la toxine tétanique, l'herpès virus EHV-1 et le réovirus équin 1 et 3 (Zientara, 2003 ; Zientara et Dauphin, 2003). La protection par ce type de vaccins est fortement associée aux taux élevés d'anticorps circulants spécifiques de la molécule HA (Paillot, 2007). Ces anticorps sont mesurés par la méthode d'hémolyse radiale simple (SRH) (Mumford et Wood, 1992 ; Newton et al., 2000). Le profil des anticorps induit par les vaccins à base de virus influenza inactivé est composé seulement d'anticorps ayant une durée de vie courte (<100 jours post vaccination), d'isotype IgG(T) majoritairement (Nelson et al., 1998), les animaux sont protégés cliniquement jusqu'à 3 mois après vaccination (Lunn et al., 2001), ce qui nécessite des revaccinations fréquentes tous les 3 à 4 mois pour conférer une protection. De nouvelles formulations, comprenant des adjuvants mieux adaptés, augmentent la durée d'immunité jusqu'à 6 mois en conditions expérimentales (Mumford et al., 1994a,c).

b. Vaccins sous-unitaires

Les vaccins sous-unitaires actuels contiennent les protéines purifiées HA et NA qui présentent de nombreux épitopes reconnus par les anticorps et sont les principales cibles de la réponse immunitaire développée après une infection naturelle par EIV (Paillot, 2007). Des molécules telles que les saponines (Quil A) (Equilis Equeenza®, Intervet) ou des systèmes de présentation d'antigènes (*Immune Stimulating complexes*, ISCOMS) (Equip®, Schering-Plough) permettent également d'élargir et de prolonger la réponse des anticorps jusqu'à 15 mois après la 3^{ème} dose vaccinale (2 immunisations intramusculaires à 6 semaines d'intervalle et une immunisation de rappel 5 – 6 mois plus tard) (Mumford et al., 1994a,b). Les vaccins ISCOM seraient également en mesure de stimuler la réponse immune à médiation cellulaire (Heldens et al., 2009). Ce vaccin a montré qu'il stimulait davantage l'immunité et sur un laps de temps plus long qu'un vaccin inactivé (Mumford et al., 1994a,b). De plus, Crouch et al. (2004, 2005) ont permis de montrer l'efficacité de ce vaccin, celui-ci induit un taux d'IgG circulants qui permet une protection immunitaire semblable à celle observée lors d'une infection naturelle. Toutefois, l'immunité induite par les vaccins sous-unitaires est limitée et dépend du rôle des antigènes composant le vaccin dans la protection (Hannant et al., 1994).

c. Vaccins à ADN

Ces vaccins ont été mis au point chez le cheval suite à son efficacité démontrée chez d'autres espèces (Fynan et al., 1993 ; Webster et al., 1994 ; Olsen et al., 1997). Ils sont constitués de plasmides recombinés avec le gène de l'hémagglutinine, sont encore à l'étude. Il semble qu'ils confèrent une protection partielle à complète plus semblable à l'infection naturelle (Lunn et al., 1999; Soboll et al., 2003a, 2003b) par injection intramusculaire ou sous-cutanée. La protection est associée, pour des raisons encore inexplicées, à la présence d'IgG locales et à l'absence d'IgA dans les sécrétions nasales (Zientara, 2003 ; Zientara et Dauphin, 2003). Malgré un coût peu élevé, une bonne stabilité ainsi qu'une lyophilisation

facile, il est difficilement utilisable en pratique car il existe une variabilité quant à la protection qu'il conférerait. De plus, il nécessite de nombreux points d'inoculation (peau et muqueuses) ainsi que de nombreux rappels (Lunn et al., 1999 ; Paillot et al., 2006). Mais les techniques actuelles ne sont pas pratiques sur terrain et aucun vaccin n'a été autorisé à ce stade (Soboll et al., 2010).

8.2.2) Vaccins vivants

Les vaccins dits vivants regroupent ceux contenant du virus vivant atténué ou des vecteurs viraux.

a. Vaccins à base de virus vivants atténués « Cold-Adapted »

L'immunisation par un virus vivant atténué est similaire à l'infection naturelle. Récemment, un vaccin contenant un virus thermosensible (Ts) vivant adapté au froid (Flu Avert[®] I.N. Vaccine; Intervet) dérivé d'un virus sauvage A/eq/Kentucky/1/91 (H3N8) administré par voie intra-nasale est commercialisé aux USA et au Canada (Lunn et al., 2001 ; Townsend et al., 2001). Ce vaccin protège également les poneys contre une infection par un virus influenza hétérologue (Chambers et al., 2001). Les poneys vaccinés présentent également une protection significative quand ils sont infectés 6 mois post immunisation (Daly et Mumford, 2001) et une pyrexie réduite lors d'une infection 12 mois post immunisation. Ainsi donc, la vaccination avec ce vaccin vivant atténué a induit une immunité de longue durée qui limite très clairement la sévérité des signes cliniques de la maladie et l'excrétion virale après infection expérimentale par EIV (Paillot et al., 2006).

b. Vaccins à base de poxvirus recombinant

Les vaccins à base de vecteurs vivants recombinants sont construits par l'insertion de gènes sélectionnés provenant du pathogène d'intérêt à l'intérieur de virus vivants et infectieux. Plus récemment, un vaccin vectorisé basé sur un virus canarypox recombinant (Proteq Flu[®], Merial Ltd, UK) a été développé pour une utilisation chez le cheval (Minke et

al., 2004 ; Minke et al., 2006). Il est composé de deux virus (canarypox) recombinants exprimant les gènes HA (Minke et al., 2007) des souches influenza de sous-type H3N8 A/eq/Newmarket/2/93 (lignage Américain) et A/eq/Kentucky/94 (lignage Européen) (Bryant et al., 2010). Ce vecteur viral a la capacité d'infecter une cellule hôte et permet l'expression des hémagglutinines immunogènes mais n'est pas capable de se répliquer dans les cellules équine (Vandaële, 2004). L'immunité se développe alors deux semaines après la vaccination (Edlund et al., 2005) et elle semble persister plus longtemps qu'avec les vaccins conventionnels. Ce vaccin appartient au groupe des vaccins influenza de la deuxième génération, induit à la fois une immunité cellulaire et humorale (Soboll et al., 2010). La durée de l'immunité est plus de 5 mois après 2 primovaccinations et d'au moins un an après 3 immunisations (Minke et al., 2007). Le vaccin ProteqFlu[®] est donc efficace pour prévenir l'infection induite par une souche récente du virus EIV (Paillot et al., 2006).

c. *Virus influenza vivant atténué développé par génétique inversée*

La génétique inversée permet de générer des virus influenza recombinants totalement artificiels à partir de plasmides d'ADN (Schickli et al., 2001). De tels virus recombinants restent néanmoins à tester *in vivo* chez le cheval afin d'analyser et d'évaluer leur antigénicité comme virus vaccinal et leur efficacité à protéger contre une infection expérimentale avec un virus sauvage (Paillot et al., 2006).

8.2.3) Protocole

Les plannings de vaccination diffèrent selon les réglementations nationales, les types de vaccin, les recommandations des fabricants et la présence d'anticorps maternels. Le protocole habituel de primovaccination consiste en 2 injections de vaccin à 4-6 semaines d'intervalle, avec un premier rappel après 6 mois. Le programme des rappels ultérieurs doit être respecté, car la durée d'immunité des vaccins contre la grippe équine, est assez courte. Les fabricants de vaccins prescrivent, des rappels de vaccination 6 à 12 mois plus tard. Il est

recommandé de vacciner les juments dans les 4 à 6 semaines qui précèdent la mise-bas, afin d'assurer le transfert par le colostrum d'un niveau suffisant d'anticorps protecteurs. La majorité des poulains nés de mères correctement vaccinées ne sont pas vaccinés avant l'âge de 6 à 9 mois (OIE, 2008a), afin que les anticorps d'origine maternels aient eu le temps de disparaître, à cause de la tolérance et, au long terme, une faible réponse immunitaire (Cullinane et al., 2001). Les poulains issus de mères non vaccinées, peuvent être vaccinés plus jeunes à partir de l'âge de 2 mois en particulier en période de risque élevé. Avant cet âge, le poulain n'est pas encore capable de développer une bonne réponse immunitaire (Barrier et Grobois, 2006). De plus, dans certains pays la vaccination est obligatoire pour les chevaux de sport qui participent à des compétitions relevant des organismes équestres.

Partie expérimentale

Chapitre I : Matériels et méthodes

I/ Matériels

I.1. Les lieux d'étude

I.1.1/ La Jumenterie de Chaou Chaoua et son Club Équestre

La Jumenterie de Chaou Chaoua est une institution située dans la commune de Tiaret, daïra de Tiaret, Wilaya de Tiaret, appartenant foncièrement au Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural. Cette Jumenterie est spécialisée dans la reproduction des chevaux de race Pur-Sang Arabe et Barbe, parfois croisements des Arabes Barbes.

I.1.2/ L'annexe de l'ONDEEC

L'annexe est une institution située dans la commune de Tiaret, daïra de Tiaret, Wilaya de Tiaret et gérée par l'Office National de Développement de l'Élevage Équin et Camelin (ONDEEC), appartenant foncièrement au Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural. Cette annexe joue le rôle d'une station de monte où se déroule la saillie des juments de l'ONDEEC et celles des propriétaires privés de la région, parfois la programmation des courses d'endurance et de saut d'obstacles. Les chevaux qui peuplent cette station, sont de races différentes : Pur-Sang Arabe, Barbe, Arabe Barbe, Anglo-Barbe et Pur-Sang Anglais.

I.1.3/ Les champs de course de Barika, d'El-Eulma (Bazer-Sakra) et de Tiaret (KAID Ahmed)

Les champs de courses de Barika, d'El-Eulma et de Tiaret sont des institutions appartenant foncièrement respectivement aux communes de Barika, de Bazer-Sakra et de Tiaret, aux daïras de Barika, d'El-Eulma et de Tiaret, et aux Wilayas de Batna, de Sétif et de Tiaret respectivement. Ces hippodromes sont gérés par la société des courses hippiques et du pari mutuel (SCHPM) dont la direction générale est Alger. Ainsi, chaque champ de course est géré par un directeur d'hippodrome. Dans ces champs sont programmées les courses de chevaux de race Pur-Sang Arabe et Pur-Sang Anglais une fois par semaine.

I.2. Les animaux

Les chevaux ayant fait partie de l'étude appartiennent à la Jumenterie de Chaou Chaoua, le Club Équestre, l'annexe de l'ONDEEC et le Champ de course de la région de Tiaret et à des propriétaires privés dans les champs de courses d'El-Eulma et de Barika. La majorité des chevaux est nés et élevés en Algérie. Au total, l'étude sérologique a été réalisée sur un effectif de 297 chevaux, dont 113 mâles et 184 femelles âgés de 8 mois à 26 ans. La majorité des équidés est de races Pur-sang arabe, Barbe et Pur-sang anglais. Aucun équidé né et élevé en Algérie de cette étude n'a été vacciné contre le virus de la grippe équine, alors que l'état vaccinal des chevaux importés est inconnu.

Des écouvillons naso-pharyngés (ENP) ont été prélevés sur 12 chevaux non vaccinés, de races Pur-sang arabe, Barbe et Arabe-Barbe, âgés entre 18 mois et 13 ans dans la Wilaya de Tiaret (ouest algérien), dont 7 dans la Jumenterie de Chaou Chaoua en Mai 2011 et 5 et dans un haras privé à Sougueur (Daïra située à 27 Km au Sud-Est du chef-lieu de la Wilaya de Tiaret) en Juillet 2011.

II/ Méthodes

II-1) Prélèvements sanguins

Les échantillons sanguins ont été prélevés par ponction de la veine jugulaire dans des tubes stériles sans anticoagulant (type Vacutainer) entre Mai 2009 et Janvier 2010. Après coagulation pendant 24 heures à 4°C, les échantillons ont été centrifugés (3000g, 15 minutes, température ambiante) et les sérums ont été recueillis puis stockés à -20°C jusqu'à analyse.

II-2) Les écouvillons naso-pharyngés (ENP)

Les écouvillons naso-pharyngés ont été collectés par les vétérinaires cliniciens des Haras sur des chevaux présentant des symptômes similaires à ceux provoqués par les virus grippaux tels que de la toux quinteuse, l'écoulement nasal et une forte fièvre (39-40°C). Après collection, les échantillons d'ENPs ont été placés dans 5 ml du milieu de transport virologique

(VTM) constitué du tampon de phosphate salé (PBS), 5000 u/ml de pénicilline, 250 mg/ml Amphotéricine B et 2 % v/v de sérum de veau fœtal, puis conservés à – 20 °C pendant 3 mois jusqu'à analyse.

II-3) Analyses

II-3.1) Analyses sérologiques

Deux techniques de diagnostic sérologique de l'infection grippale ont été utilisées : la technique ELISA et le test d'Inhibition de l'Hémagglutination (test IHA). Cette dernière est considérée à ce jour comme méthode de référence par l'organisation mondiale de la santé animale (OIE) (OIE, 2008a).

A) La technique ELISA : La technique ELISA a été réalisée à l'aide de deux trousse de diagnostic sérologique.

A.1) Le coffret Flu DETECT™ BE (Synbiotics): Selon les instructions du fabricant de la trousse ELISA Flu DETECT® BE (Synbiotics), 113 sérums provenant de la région de Tiaret (la Jumenterie de Chaou Chaoua, le Club Équestre, ONDEEC et le Champ de course) ont été analysés au Laboratoire de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Mascara (Algérie).

A.1.1) Principe du test : Le coffret Flu DETECT™ BE utilisé pour la technique Immuno-Enzymatique en vue de la détection des anticorps anti-influenza A dans les échantillons de sérum ou de plasma. La réaction est composée de trois étapes :

- Chaque échantillon de sérum ou de plasma est déposé dans un puits sensibilisé avec la nucléoprotéine virale (NP) de l'antigène. Les anticorps présents dans l'échantillon se lient avec l'antigène qui enduit la plaque.
- Après avoir bien rejeté, le liquide en dehors de chaque puits, un HRP-Conjugué anti-anticorps AIV est ajouté. Cet anticorps monoclonal, lie la

nucléoprotéine viral (NP) de l'antigène spécifique épitope, se fixe sur les sites libres de l'antigène formant un complexe:

(Ag) - (Mab nucléoprotéine anti - (NP) viral antigène / peroxydase).

- L'excès de conjugué est éliminé par l'étape du lavage. L'enzyme lié au complexe est révélé par l'addition du substrat qui est transformé en un produit coloré (couleur verdâtre). Les densités optiques correspondantes sont lues à une seule longueur d'onde 405 ou 410 nm:

- En l'absence d'anticorps dans l'échantillon, une coloration de la réaction est observée due à la réaction de l'enzyme conjugué, lequel est lié à l'antigène libre fixé au support solide.
- En la présence des anticorps anti- virus grippal dans l'échantillon, moins d'enzyme conjugué est lié aux sites antigéniques dans le support solide et la coloration de la réaction est diminuée.

A.1.2) Composition et Conservation (Tableau 2)

Nature du réactif	Reconstitution et conservation
4 micros plaques contiennent 12 bandes de 8 puits sensibilisé par la nucléoprotéine virale (NP) de l'antigène.	Utilisez dans les 4 semaines après avoir ouvert le sachet qui doit être fermé après usage.
Conjugué : la nucléoprotéine virale (NP) de l'antigène spécifique Mab- peroxydase (CJ) (100 x concentré).	Diluée 100 fois dans le tampon de la dilution et utilisée 2 heures après la dilution.
Substrat tamponné peroxydase (ABTS)	Préparez à usage
Control Négative (NC)	Préparez à usage
Contrôle positive (PC)	Préparez à usage
Solution de lavage (W) (20 x concentré)	Diluée 20 fois dans l'eau distillée ou déminéralisée. Utilisée 48 heures après la dilution.
Le Tampon de la dilution (DB) pour les échantillons et la dilution du conjugué.	Préparez à usage.
Solution d'arrêt (S) (5 x concentré)	Diluée 5 fois dans l'eau distillée ou déminéralisée. Utilisée 48 heures après la dilution.
Les films adhésifs	12 films

* Matériels nécessaires (non fourni)

- L'eau distillé ou déminéralisée.

- Pipettes réglables ou résolues pour mesurer et délivrer entre 10 à 1000 μl . La déviation de la mesure doit être $\leq 10\%$ pour les volumes $\leq 10 \mu\text{l}$ et $\leq 5\%$ pour tous les autres volumes.
- Les embouts
- Papier absorbant
- Cylindres gradués (100 ml et 1000 ml).
- Appareil du lavage manuel, automatique ou semi-automatique pour la microtitration des plaques.
- Lecteur de microplaques, avec des filtres à lecture monochromatique à 405 ou 410nm.

A.1.3) Procédure

a) Les étapes préliminaires : Avec soin distribution et identification des contrôles et des échantillons.

a.1) Préparation des échantillons de sérum : Pour un grand nombre d'échantillons:

Dispenser au minimum 100 μl d'échantillon dans un tissu de culture propre de 96 puits de la micro-plaque. Laissez les puits A1 à A4 vides. Les échantillons du sérum gelés doivent être complètement fondus ; mélanger avant de les diluer entièrement.

a.2) Préparation de la solution conjuguée

Les Anticorps de l'anti-NP HRP - Conjugué est fourni comme une solution de réserve. Dilué 100 μl de la solution conjuguée de réserve dans 10 ml du tampon de la dilution (Les dilutions, 1:100). Mélanger bien. Cette préparation de 10 ml obtenue est suffisante pour la conjugaison d'une plaque ELISA de 96 puits.

a.3) Préparation de la solution de lavage (1 x W)

Diluer 25 ml du concentré de la solution de Lavage dans 475 ml d'eau distillée ou déminéralisée (Les dilutions, 1:20). Mélanger bien. Chaque plaque de 96 puits nécessite approximativement 500 ml de la solution de lavage.

a.4) Préparation de la solution de substrat

La solution de substrat est prête à utiliser. Chaque Plaque exigera approximativement 10 ml de la solution du substrat.

a.5) Préparation de la solution d'arrêt (1 x S)

Diluer 2,5 ml du concentré de la solution d'arrêt dans 10 ml d'eau distillée ou déminéralisée (Les dilutions, 1:5). Mélanger bien. Approximativement 12,5 ml de la solution d'arrêt est exigée par une plaque ELISA de 96 puits.

b) Procédure du Test

b.1) Distribution des échantillons et du contrôle

b.1.1) Distribution des échantillons

Les échantillons du sérum gelés doivent être complètement fondus et entièrement mélangés avant dilution.

- Ajout de 75µl du tampon de la dilution dans les puits de la plaque du test sauf les puits A1 à A4.
- Ajout de 25µl du sérum à tester par puits (dilution, 1:4). Débuter avec le puits A5 et en terminer avec le puits H12. Le transfert d'échantillons à la plaque de l'épreuve devrait être effectué aussi rapidement que possible.
- Secouer doucement la plaque manuellement pour mélanger.

b.1.2) Distribution du contrôle

- Ajout de 100µl de contrôle négatif (CN) aux puits A1 et A2, et 100 µl de contrôle positif (CP) aux puits A3 et A4.
- Couverture des puits par le film adhésif.
- Secouer doucement la plaque manuellement pour mélanger.

b.1.3) Incubation de la plaque

- Incubation pendant 1 heure à la température de la pièce du laboratoire ($23 \pm 3^{\circ}\text{C}$).

b.2) Addition du conjugué

b.2.1) Distribution du conjugué

Ajout de 100 µl du conjugué dilué dans tous les puits et les couvrir avec un nouveau morceau de film adhésif.

b.2.2) Incubation du conjugué

- Incubation pendant 30 minutes à la température de la pièce du laboratoire ($23 \pm 3^{\circ}\text{C}$).

b.2.3) Lavage

- Avec soin, enlèvement du film adhésif, puis lavage 5 fois avec un appareil du lavage automatique.
- Renversement de la plaque pour s'assurer que tout le liquide résiduel est enlevé.

b.3) Révélation

b.3.1) Addition du substrat

- Ajout de 100µl du substrat tamponné peroxydase par puits.
- Secouer doucement la plaque manuellement pour mélanger.

b.3.2) Incubation du substrat

- Incubation pendant 15 minutes à la température de la pièce du laboratoire ($23 \pm 3^{\circ}\text{C}$), à l'abri de la lumière.

b.3.3) Addition de la solution d'arrêt

- Ajout de 100µl de la solution d'arrêt diluée par puits.
- Secouer doucement la plaque manuellement pour mélanger.

b.3.4) Mesure de la densité optique

- Mesure de la densité optique (D.O) monochromatique à 405 nm (la bande verte).

A.1.4) Validation du Test : Le Flu DETECT™ BE est valide, quand le résultat obtenu:

- La valeur moyenne de la densité optique (D.O) des contrôles négatifs (A1, A2) est $0,500 + / - 0,15$.

- Le rapport S/N, de la valeur moyenne de la densité optique (D.O) des contrôles positifs (A3, A4) doit être inférieur à 0,6. Ce rapport S/N est calculé comme suit:

$$S/N = \frac{\overline{DO_{CP}}}{\overline{DO_{CN}}}$$

Les valeurs obtenues pour notre étude sont (Tableau 3) :

Densité optique Plaque	DO _{CP}	DO _{CN}	DO _{CP} / DO _{CN}
Plaque n°1	0,299	0,509	0,587
Plaque n°2	0,277	0,491	0,564
Plaque n°3	0,260	0,497	0,523
Plaque n°4	0,288	0,512	0,562

A.1.5) Expression et interprétation des résultats

- Divisez D.O lue de l'échantillon par la D.O moyenne Négative.
- Lorsque le rapport S/N est supérieur ou égal à 0,6 l'échantillon est considéré négatif et lorsqu'il est inférieur à 0,6 l'échantillon est considéré positif.

Ce rapport S/N est calculé comme suit:

$$S/N = \frac{\overline{DO \text{ lue pour l'absorbance de l'échantillon}}}{\overline{DO_{CN}}}$$

A.2) Le coffret ID Screen[®] Influenza A Antibody Competition (ID VET)

Selon les instructions du fabricant de la trousse ELISA ID Screen[®] Influenza A Antibody Competition (ID VET), 184 échantillons (15 sérums d'équidés provenant de la région de Tiaret (Jumenterie de Chaou Chaoua), 64 sérums d'équidés de la région de Barika (Champ de Course) et 105 sérums d'équidés provenant de la région d'El-Eulma (Champ de Course) ont été analysés au Laboratoire Régional de Médecine Vétérinaire de Tlemcen (Algérie).

A.2.1) Description et principe

- Les puits sont enduits par l'antigène A.

- Les spécimens à tester et les contrôles sont ajoutés au micro-puits. S'il y a présence des anticorps anti-antigène A, il y aura formation d'un complexe anticorps-antigène lequel masque les épitopes de l'Ag A.
- Un anti-Ag A peroxydase (Po) conjugué, est ajouté au micro-puits. Il se fixe au reste des épitopes libres de l'Ag A, formant un complexe antigène-conjugué-peroxydase.
- Après le lavage pour éliminer l'excès du conjugué, la solution du substrat (TMB) est ajoutée.
- La coloration résultante, est dépendante de la quantité des anticorps spécifiques présents dans le spécimen à tester :
 - En l'absence d'anticorps, les solutions apparaissent bleues lesquelles deviennent jaunes après addition de la solution d'arrêt.
 - En présence des anticorps, il n'y a aucune coloration observée.
- Les micro-plaques sont lues à 450 nm.

A.2.2) Composition et conservation (Tableau 4)

Réactifs	Avant ouverture	Après ouverture
Micro-plaques enduit avec l'antigène A.	+ 2°C à + 26°C	Refermer hermétiquement le sachet. Se conserve ainsi 2 mois après ouverture à + 2 à + 8°C
Solution du conjugué (10 X)	+ 2 à + 8°C	Non dilué : + 2 à + 8°C Dilué : Se conserve jusqu'à 24 heures à + 2 à + 26°C
Contrôle positif	+ 2 à + 8°C	+ 2 à + 8°C
Contrôle négatif	+ 2 à + 8°C	+ 2 à + 8°C
Tampon de la dilution 3	+ 2 à + 26°C	+ 2 à + 26°C
Tampon de la dilution 2	+ 2 à + 26°C	+ 2 à + 26°C
Solution de lavage (20 X)	+ 2 à + 26°C	Non dilué : + 2 à + 26°C Dilué : Se conserve jusqu'à 3 jours à + 2 à + 26°C
Solution du substrat	+ 2 à + 8°C	+ 2 à + 8°C. Bien refermer le flacon après chaque utilisation. Préserver le contenu de la lumière
Solution d'arrêt (H ₂ SO ₄ 0,5 M)	+ 2 à + 26°C	+ 2 à + 26°C

* Matériels nécessaires (non fourni)

- Mono ou multicanaux micropipettes pour délivrer des volumes de 10 µl, 100 µl et 200 µl.

- L'eau distillé ou déminéralisée.
- Les embouts
- Papier absorbant
- Appareil du lavage manuel ou automatique.
- Lecteur de microplaques de 96 puits.

A.2.3) Procédure

a) Préparation de la solution de lavage

- Préparer la solution de lavage (1X) par la dilution de la solution du concentré du lavage (20X) dans l'eau distillée ou déminéralisée.

b) Procédure du Test

b.1) Préparation de la plaque

b.1.1) Distribution des échantillons et du contrôle

- Ajout de 90 µl du tampon de la dilution (2) dans tous les puits de la plaque
- Ajout de 10 µl du contrôle positif dans les puits A1 et B1.
- Ajout de 10 µl du contrôle négatif dans les puits C1 et D1.
- Ajout de 10 µl du sérum à tester dans le reste des puits.

b.1.2) Incubation de la plaque

- Incubation pendant 1 heure \pm 5 minutes à 37°C (\pm 2°C).

b.2) Lavage

- Videz les puits.
- Lavez bien tous les puits 3 fois avec approximativement 300 µl de la solution de lavage.
- Évitez de sécher des puits entre lavages.

b.3) Incubation du conjugué

- Préparation du conjugué (1X) par la dilution de la solution du conjugué concentré (10X) à 1/10 dans le tampon de la dilution 3.
- Ajout de 50 µl de la solution du conjugué (1X) pour chaque puits.
- Incubation pendant 30 minutes ± 5 minutes à 21°C (± 5°C).

b.4) Lavage

- Videz les puits.
- Lavez bien tous les puits 3 fois avec approximativement 300 µl de la solution de lavage.
- Évitez le dessèchement des puits entre lavages.

b.5) Révélation

- Ajout de 50 µl de la solution du substrat pour chaque puits.
- Incubation pendant 10 minutes ± 1 minutes à 21°C (± 5°C) à l'abri.
- Ajout de 50µl de la solution d'arrêt pour chaque puits pour arrêter la réaction.
- Lecture des plaques à une densité optique (D.O) de 450 nm.

A.2.4) Validation

Le test est validé si :

- La valeur moyenne de la densité optique (D.O) des contrôles négatifs (DO_{CN}) est supérieure à 0,700.

$$DO_{CN} > 0,700$$

- La valeur moyenne de la densité optique (D.O) des contrôles positifs (DO_{CP}) est inférieure à 30 % de DO_{CN}

$$DO_{CP} / DO_{CN} < 0,3$$

Les résultats obtenus pour notre étude sont (Tableau 5) :

Densité optique Plaques	DO _{CP}	DO _{CN}	DO _{CP} / DO _{CN}
Plaques n°1	0,1165	1,242	0,093
Plaques n°2	0,1435	1,367	0,104

A.2.5) Interprétation

- Pour chaque puits, on calcule le pourcentage de compétition (% compétition) :

$$\% \text{ Compétition} = \frac{\text{DO}_{\text{spécimen}}}{\text{DO}_{\text{CN}}} \times 100$$

- Les échantillons qui présentent un % de compétition :
 - Supérieur ou égal à 50 % sont considérés négatifs
 - Compris entre 45 % et 50 % sont considérés douteux
 - Inférieur ou égal à 45 % sont considérés positifs

B) La technique d’Inhibition de l’Hémagglutination (IHA)

Le test d’Inhibition de l’Hémagglutination (IHA) a été réalisé au Laboratoire de Pathologie Équine (LPE) de l’Anses de Dozulé (France) selon les recommandations de l’OIE. Après avoir été acheminés sous régime du froid, les sérums ont été analysés par le test IHA en utilisant différentes souches du virus de la grippe équine, une souche de sous-type H7N7 Prague/1956 (H7N7), et deux souches de sous-type H3N8 appartenant au lignage pré-divergent: la souche H3N8/Russie/1983 et H3N8/Miami/1963. Les témoins sérums (positifs et négatifs) ont été fournis par le laboratoire.

B.1) Matériels et solutions nécessaires

- Eau physiologique (Tableau 6) : à 8.5%

Solution	Quantité
Chlorure de Sodium (NaCl)	8.50 g
Eau distillée ou de qualité équivalente	QSP 1L

Stériliser par autoclavage à $121^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 30 min.

- Solution tamponnée au phosphate PBS (Phosphate Buffered Saline Solution)

(Tableau 7)

Solution	Quantité
Dihydrogénophosphate de Potassium (KH_2PO_4)	0.21g
Hydrogénophosphate de di-sodium dihydraté ($\text{Na}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$)	0.80g
Chlorure de Sodium (NaCl)	8.12g
Eau distillée ou de qualité équivalente	QSP 1L

Ajuster le $\text{pH}=7.2\pm 0.1$.

Stériliser par autoclavage à $121^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 30 min.

- Solution de périodate de potassium : Préparer extemporanément une solution de périodate de potassium à 0,016 M (soit 0,38 g de périodate de potassium dans 100 ml de PBS).
- Solution de glycérol à 3 % en PBS (volume à volume).
- Les plaques à fond rond de 96 puits ;
- Mono et multicanaux micropipettes réglables ou résolues pour mesurer et délivrer entre 10 à 1000 μl ;
- Embouts ;
- Solution de NaCl 0,85 %.

B.2) Préparation des Globules Rouges de poulet CRBC (Chicken Red Blood Cells)

- Prélever le sang de poulet en présence d'un anticoagulant (Héparine par exemple)
- Mélanger par agitation douce.
- Centrifuger le sang prélevé en présence d'anticoagulant à 1 500 t/mn pendant 5 min à $5\pm 3^{\circ}\text{C}$.
- Éliminer le surnageant.

- Laver les globules rouges (CRBC) avec de l'eau physiologique (le volume d'eau physiologique doit être à peu près égal au volume de surnageant éliminé après la première centrifugation).
- Centrifuger à 1500 t/mn pendant 5 min à $5\pm 3^{\circ}\text{C}$.
- Répéter cette étape de lavage des CRBC avec de l'eau physiologique trois fois.
- Après ces trois lavages, laver les CRBC avec la solution tamponnée au phosphate (PBS).
- Centrifuger à 1 500 t/mn pendant 20 min à $5\pm 3^{\circ}\text{C}$.
- Éliminer le surnageant.
- Dénombrer les CRBC.
- Diluer les CRBC de manière à obtenir une solution de CRBC à 8 ± 5.10^6 cellules/ml. Cette suspension de CRBC peut-être conservée pendant 7 jours à $5\pm 3^{\circ}\text{C}$.

B.3) Prétraitement des sérums avant test IHA

- Mélanger 150 μl de sérum avec 300 μl de solution de périodate de potassium 0,016M ;
- Incuber à $22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 15 minutes ;
- Ajouter 150 μl de glycérol à 3 % ;
- Mélanger et incuber à $22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 15 minutes ;
- Inactiver le mélange à 56°C pendant 30 minutes.

B.4) Mode opératoire

B.4.1) Titration de l'activité hémagglutinante du virus EIV

- Distribuer 25 μl de PBS dans toutes les cupules d'une plaque de 96 puits à fond rond, à l'exception des quatre dernières cupules de la première colonne (E1, F1, G1 et H1) qui en reçoivent 33 μl .

- Introduire la suspension virale à titrer dans les cupules de la première colonne, à raison de 25µl dans les quatre premières cupules (A1, B1, C1 et D1) et de 18 µl dans les quatre dernières autres (E1, F1, G1 et H1).
- A l'aide d'une micropipette, mélanger le contenu de chaque cupule de la première colonne et en transférer 25 µl dans la cupule suivante de la même rangée. Procéder ainsi de suite de colonne en colonne jusqu'à l'extrémité de la plaque et éliminer les 25 µl de la dilution faite dans la dernière colonne.

(Note : réserver les quatre dernières cupules de la dernière colonne (E12, F12, G12 et H12) pour les témoins-hématies. Ces cupules ne reçoivent pas d'antigène).

- Ajouter 25 µl de suspension de CRBC préalablement à 8 ± 5.10^6 cellules/ml.
- Mélanger en tapotant les rebords de la microplaque
- Incuber à $22 \pm 3^\circ\text{C}$ pendant 30 minutes.
- Lire les résultats et en déduire le titre de la suspension virale utilisée.

B.4.2) Ajustement à 4 HA de la suspension virale

- Diluer la suspension virale de manière à obtenir une 4HA.
- Contrôler le titre de la suspension virale diluée à 4HA comme suit (Fig. 11) :

	A	B	C	D	E	F	G	H	
1	2*	4*	8*						
2	Z1	Z4		Z8					
3									
4									
5	3*	6*	12*						
6	Z2	Z5		Z8					
7									
8									
9	5*	10*	20*						
10	Z3	Z6		Z8					
11									Z7
12									

Légende

Z= Zone

Z1 et Z4 = dilutions de la suspension virale à 4HA du 1/2 au 1/8.

Z2 et Z5 = dilutions de la suspension virale à 4HA du 1/3 au 1/12.

Z3 et Z6 = dilutions de la suspension virale à 4HA du 1/5 au 1/20.

Z7 = témoins CRBC

Z8 = non utilisé

*= inverse de la dilution obtenue.

Les cupules de la zone	Reçoivent avant dilution		Reçoivent de la colonne précédente après homogénéisation µl	Suspension de CRBC µl
	PBS µl	Suspension virale à 4HA µl		
Z1	25	25	-	25
Z2	34	17	-	25
Z3	40	10	-	25
Z4,Z5,Z7	25	-	25 ^(a)	25
Z7	25	-	-	25

(a) Rejet de 25 µl des cupules de la dernière colonne, après homogénéisation.

- Après avoir ajouté la suspension de CRBC (Fig. 12), mélanger en tapotant les rebords de la microplaque.
- Incuber à $22 \pm 3^\circ\text{C}$ pendant 30 minutes.
- Lire les résultats et en déduire le titre de la suspension virale utilisée.
- L'ajustement à 4HA de la suspension virale est considérée comme correct si toutes les cupules contenant les dilutions de celle-ci $\leq 1/4$ (A1 à A8 et B1 à B4), et seulement elles, présentent une hémagglutination totale.

B.4.3) Titration des anticorps inhibant l'hémagglutination (test IHA)

- Distribuer dans toutes les cupules 25µl de suspension virale à 4HA
- Ajouter dans les cupules de la première ligne 25 µl de sérum à tester (deux cupules par sérum à tester).

- A l'aide d'une micropipette, mélanger le contenu de chaque cupule de la première ligne et en transférer 25 µl dans la cupule de la ligne suivante. Procéder ainsi de suite de ligne en ligne jusqu'à l'extrémité de la plaque et éliminer les 25 µl de la dilution faite dans la dernière ligne.

Nota : Garder deux cupules pour réaliser un témoin de la suspension virale (25µl de suspension virale) et deux cupules pour réaliser un témoin « CRBC » (25µl de PBS).

- Incuber à $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ pendant 30 minutes.
- Ajouter 25 µl de la suspension de CRBC à 8 ± 5.10^6 cellules/ml.
- Mélanger en tapotant les rebords de la microplaque
- Incuber à $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ pendant 30 minutes.
- Lire les résultats.

B.4.4) Expression des résultats : Le test IHA n'est validé que si toutes les conditions suivantes sont satisfaisantes :

- ✓ Les cupules témoins CRBC présentent une sédimentation totale
- ✓ Le titre annoncé du sérum contrôle positif est retrouvé à une dilution près
- ✓ Le titre du sérum contrôle négatif est $\leq 1/8$
- ✓ Les cupules témoins « suspension virale » présentent une hémagglutination totale.

Le titre IHA d'un sérum correspond à la dilution la plus élevée de ce dernier entraînant une inhibition totale de l'hémagglutination.

Tout sérum ayant un titre $\geq 1/16$ est considéré comme positif.

II.3.2) Analyse statistique

Le traitement statistique des données sérologiques a été réalisé par un test paramétrique (test du Khi-2) avec correction de Yates si nécessaire, à l'aide du logiciel Excel Stat (Version, 2010.4.01) et a permis d'analyser les effets de l'âge, de la race, du sexe et de

l'origine géographique sur la séroprévalence du virus grippal. Les différences ont été considérées comme significatives avec un risque d'erreur de 5%.

II.3.3) Analyses virologiques

Les analyses virologiques ont été réalisées au Laboratoire de Pathologie Équine (LPE) de l'ANSES de Dozulé (France). Après avoir été acheminés sous régime du froid, les ENPs ont été analysés par deux techniques de diagnostic virologique de l'infection grippale : la PCR en temps réel dite quantitative (qRT-PCR) et l'isolement de virus infectieux.

A) Traitement des écouvillons

L'écouvillon naso-pharyngé, immergé dans le milieu de culture, est trituré et écrasé afin de libérer les particules virales dans le liquide. Ce liquide est ensuite aliquoté en 1,25 ml et congelés à - 80°C pour l'extraction et la mise en culture.

B) Isolement du virus

L'isolement de virus infectieux a été réalisé par culture sur œufs, exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS), embryonnés de poule et sur des cellules de rein de chien (MDCK).

B.1) Sur œufs

B.1.1) Matières premières et tampons nécessaires

a) Matériels

- Micropipettes
- Pipettes stériles
- Cônes à filtres stériles
- Seringues de 1 ml stériles
- Aiguilles de type 26G 0.45x12 mm (\varnothing x l)
- Tubes stériles
- PipetAid

- Incubateur à œufs
- Autoclave
- Ciseaux stériles (une paire par échantillon)
- Pincettes à disséquer stériles

b) Matières premières

- Échantillons à analyser
- Œufs embryonnés (au minimum 5 par échantillon + 4 à 5 pour les contrôles positifs et négatifs)
- Pénicilline
- Streptomycine
- Gentamycine
- Fungizone
- Tampon de dilution (PBS, MEM ou autre)

B.1.2) Mode opératoire

a) Les œufs embryonnés

- Placer les œufs embryonnés dans l'incubateur à œufs dont la température est réglée à 37°C sous agitation.
- Mirer les œufs après 9 jours d'incubation. Marquer d'une croix l'endroit où l'inoculation de l'échantillon sera réalisée (environ 2 mm au-dessus de la ligne du sac aérien et où la distance entre l'embryon et le point d'inoculation est la plus grande).
- Éliminer tous les œufs à embryon morts.

b) Préparation des échantillons à analyser

- Ajouter les antibiotiques (Pénicilline-Streptomycine et Gentamycine) et l'antifongique (Fungizone) à l'échantillon à analyser et aux concentrations finales suivantes :

b.1) Concentrations finales lors du passage P1 des échantillons à analyser (Tableau 8)

Antibiotique et/ou antifongique	Concentration finale dans l'échantillon à analyser
Pénicilline	10 000 U
Streptomycine	10 mg/ml
Gentamycine	0.25 mg/ml
Fungizone	0.25 mg/ml

b.2) Concentrations finales lors des passages supplémentaires des échantillons à analyser (Tableau 9)

Antibiotique et/ou antifongique	Concentration finale dans l'échantillon à analyser
Pénicilline	200 U
Streptomycine	2 mg/ml
Gentamycine	0.05 mg/ml
Fungizone	0.05 mg/ml

Nota : Prévoir par échantillon au minimum 1.2 ml d'échantillon surchargé avec les antibiotiques et l'antifongique.

Le volume d'inoculation des échantillons à analyser est de 0.2 ml/œuf embryonné et un minimum de 5 œufs embryonnés par échantillon est inoculé.

Pour les échantillons connus comme positifs en isolement sur œuf, le volume d'inoculation peut-être de 0.1ml uniquement.

Incuber ensuite l'échantillon à 2-8°C pendant 1 heure.

c) Inoculation des échantillons dans les œufs embryonnés

- Désinfecter les œufs avec de l'alcool ou de la teinture d'iode.
- Percer un petit orifice dans la coquille sans percer la membrane à l'aide d'un graveur de lame au niveau de la croix.

- Injecter 0.1 à 0.2 ml d'échantillon préalablement traité à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille de type 26G.
- Fermer l'orifice soit avec du ruban adhésif soit avec de la paraffine
- Désinfecter les œufs ainsi inoculés avec de l'alcool
- Incuber les œufs à 35°C pendant 3 à 6 jours
- Après 24h d'incubation, les œufs sont mirés. Les œufs embryonnés morts 24h après l'inoculation sont éliminés. Les œufs embryonnés vivants après 24 h sont mirés toutes les 24h pendant 6 jours maximum.

d) Récolte du liquide allantoïdien

- Pour chaque œuf embryonné mort ou après 6 jours d'incubation, les placer à 2-8°C pendant 4h minimum (possible durant toute la nuit)
- Désinfecter les coquilles
- Découper la coquille à l'aide de ciseaux juste au-dessus de la ligne du sac aérien (prévoir une paire de ciseaux par échantillon)
- Prélever le liquide allantoïdien
- Tester chaque liquide allantoïdien par le test d'Hémagglutination (HA Test)
- Pour un échantillon identique, les liquides obtenus sur des œufs différents et ayant un titre HA identique peuvent être mélangés entre eux
- Centrifuger les échantillons positifs en HA test (titre supérieur à 16) à 2500 rpm pendant 10 minutes à 4°C
- Récupérer le surnageant après centrifugation puis l'aliqoter et réserver un volume pour le titrer à nouveau en réalisant un test HA. Conserver à une température inférieure à -70°C

Nota : Pour les échantillons négatifs ou dont le titre est inférieur à 16, un deuxième isolement sur œufs embryonnés peut-être réalisé avec le liquide allantoïdien obtenu lors du

premier isolement. Si un résultat négatif persiste après 5 passages, l'échantillon est considéré comme négatif.

B.2) Sur cellules MDCK

B.2.1) Matériels et matières biologiques nécessaires

a) Matériels

- Micropipettes
- Pipettes stériles
- Cônes à filtres stériles
- Flasques
- Tubes stériles
- PipetAid
- Filtres 0.45 µm
- Seringues (2 ou 5 ml) stériles
- Microscope inversé
- Autoclave

b) Matières biologiques

- Échantillons à analyser
- Tampon MEM
- Sodium Pyruvate 100 mM
- Pénicilline-Streptomycine
- Solution d'Hépès 1M
- Cellules MDCK (ATCC N°: CCL-34).
- Trypsine-TPCK

B.2.2) Mode opératoire

a) Préparation des tampons nécessaires

- Milieu de culture MEM complet à 0% SVF (sérum de veau fœtal) à 2 µg/ml de trypsine-TPCK : Préparer le milieu de culture en ajoutant au milieu MEM le Sodium Pyruvate à 1 mM, les antibiotiques (Pénicilline à 50 U/ml et Streptomycine à 50 µg/ml), l'Hépès à 0.025M et la trypsine TPCK à 2 µg/ml.

b) Cellules MDCK

- Pour chaque échantillon et à chaque passage, prévoir au minimum trois flasques de cellules à confluence.

c) Isolement Viral

- Laver le tapis cellulaire une fois avec du milieu de culture sans sérum à 2 µg/ml de trypsine-TPCK.

Nota : À partir de cette étape, le milieu de culture des cellules MDCK est sans sérum et à une concentration de trypsine-TPCK comprise entre 0.5 et 2 µg/ml.

- Éliminer le milieu de culture
- Inoculer en triple 0.25 ml à 0.5 ml d'échantillon à analyser
- Incuber 1 heure à 37°C - 5% CO₂
- Ajouter du milieu de culture sans sérum contenant de la trypsine-TPCK.
- Incuber à 37°C - 5% CO₂
- Observer quotidiennement au microscope la présence d'un effet cytopathogène (ECP)
- Pour les échantillons induisant un effet cytopathogène ou après 7 jours d'incubation, tester le surnageant de culture en réalisant un test HA ou une PCR.
- Aliquoter les surnageants dont le titre est supérieur à 16 en HA.
- Pour les surnageants négatifs ou ceux dont le titre est inférieur à 16, il est possible de réaliser des passages supplémentaires (jusqu'à 5 passages par échantillon).

Nota : Pour chaque passage si un effet de lyse est observé au microscope, conserver le surnageant de culture, l'identifier et le congeler à -20°C.

C) Extraction de l'ARN viral

- L'ARN a été extrait à partir de 140 µl de sécrétions nasales à l'aide de la trousse Mini kit QIAamp Viral RNA (Qiagen) conformément aux instructions du fabricant dans un volume final de 50 µl.

C.1) Préparation du carrier lyophilisé

- Ajouter 310 µl du tampon AVE dans le tube contenant 310 µg du carrier solide pour l'obtention à une solution de 1 µg/µl.

C.2) Préparation du tampon lyse

- Chauffage du tampon AVL pendant 5 min à 70 °C.
- Tampon lyse: 560 µl d'AVL + 5.6 µl du carrier par échantillon.
- Ajouter 560 µl de tampon de lyse pour chaque échantillon de 140 µl de sécrétion nasal, puis vortex plus pulse de centrifugation.

C.3) Étape de lyse

- Incubation pendant 10 min à température ambiante.
- Ajouter 560 µl d'éthanol, puis vortex plus pulse de centrifugation.

C.4) Étape de lavage

- Passer 130 µl du lysat sur une colonne du kit.
- Centrifugation 1 min à 6000 g.
- Changer de tube collecteur et renouveler l'opération avec 630 µl du lysat.
- Centrifugation 1 min à 6000 g.
- Changer de tube collecteur, rincer avec 500 µl de la solution AW1
- Centrifugation 1 min à 6000 g.
- Changer de tube collecteur, rincer avec 500 µl de la solution AW2
- Centrifugation 3 min à 20000 g.

C.5) Étape d'éluotion

- Changer le tube collecteur en mettant un cryotube.
- Ajouter 50 µl de tampon AVE.
- Incubation pendant au moins 3 min à température ambiante.
- Centrifugation 1 min à 6000 g.
- Éluat.

D) La PCR en temps réel

Afin de vérifier la positivité des spécimens, une qRT-PCR de contrôle a été réalisée, ciblant la portion du gène codant pour la protéine de matrice (M). La qRT-PCR a été réalisée à l'aide du coffret QuantiTect Virus et du coffret Rox Vial (Qiagen). En bref, le mélange réactionnel (mix) contenant 1 x un mélange de réaction de concentration finale, 1 µL de chaque amorce sens (5'-AATGGCTAAAGACAAGACC-3') et anti-sens (5'-TTTGGACAAAGCGTCTAC-3'), 0.5 µL de la sonde (CTGCAGTCCTCGCTCACTG), 5 µL du Master mix, 0.25 µL du RT mix et 14.75 µL d'eau additionnée à 2.5 µL de l'ARNv. Le programme du thermo-cycler réalisé est le suivant : 20 min à 50 °C, 5 min à 95 °C, suivie par 45 cycles à 95 °C pendant 15 s et 60 °C pendant 45 s.

E) Amplification du gène HA1

Une deuxième PCR (nested) a été réalisée afin d'obtenir une quantité d'ADN suffisante pour la détermination de la séquence de l'ARN extrait de l'échantillon clinique. La synthèse de l'ADNc a été réalisée selon la méthode des amorces du gène spécifique « Gene Specific Primer » en utilisant la trousse SuperScript III (Invitrogen life technologies) conformément aux recommandations du fabricant, le segment hybride codant l'hémagglutinine GCTATTGCTCCAAAGATTC. Pour l'amplification des produits de l'ADNc en utilisant la trousse Phusion of Finnzyme. Pour la PCR nested, 2 µL de

l'ADNc a été ajouté à un mélange de réaction contenant 1 x mélange de réaction de concentration finale, 1.25 µL de chaque amorce sens (5'-GAATGTGACAATGCCTAAC-3') et anti-sens (5'-GCTATTGCTCCAAAGATTC-3'), 5 µL du Master mix, 0.5 µL de dNTP, 0.75 µL de DMSO et 13.75 µL d'eau additionnée à 0.25 µL de chlorure de magnésium et d'Enzyme Phusion. Le mélange a été chauffé à 95 °C pendant 5 min dans le thermo-cycler, suivi par 35 cycles de 94 °C pendant 30 s, 55 °C pendant 30 s et 72 °C pendant 30 s et enfin 10 min à 72 °C.

F) Séquençage et analyse phylogénétique

Le génotypage de ce virus a été entrepris par séquençage du gène codant pour l'hémagglutinine (HA). Les produits PCR purifiés ont été séquencés par la société Beckman Coulter Genomics en utilisant les amorces utilisées pour l'amplification de l'ADNc. Nous avons donc pu comparer la séquence obtenue à celles déjà présentes dans les banques de données dans un contexte épidémiologique mondial. Pour cela, une analyse phylogénétique a été menée sur cette souche via le logiciel de phylogénie MEGA software version 5.0.

Chapitre II : Résultats et discussion

I. Résultats

I.1 Les résultats sérologiques

Dans le cadre de cette enquête, et d'après les tests IHA, 164 échantillons de sérums (55.2%) sont positifs vis-à-vis de la souche H3N8/Russie/1983 avec des titres en anticorps variant pour une majorité du 1/16^{ème} au 1/128^{ème}. D'autre part, 86 sérums (29.0%) ont présenté des anticorps reconnaissant la souche H3N8/Miami/1963 avec des titres compris entre le 1/16^{ème} et le 1/256^{ème} (Fig.13).

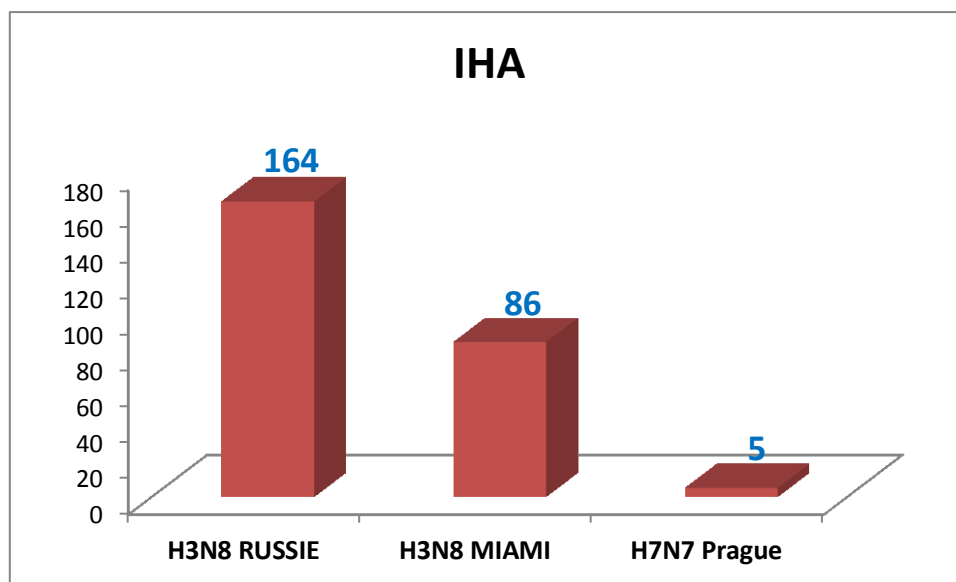


Figure 13 : Nombre de sérums positifs retrouvés dans la population étudiée par IHA.

Tous les sérums positifs vis-à-vis de la souche H3N8/Miami/1963 se sont également révélés positifs vis-à-vis de la souche H3N8/Russie/1983. Pour les tests IHA réalisés avec la souche H7N7/Prague/1956, l'ensemble des sérums de chevaux nés et élevés en Algérie n'ont pas réagi alors que 5 sérums de chevaux importés (soit 1.7%) ont été positifs avec des titres variant du 1/16^{ème} au 1/128^{ème} (Tableau 10). Parmi ces 5 chevaux, 3 (âgés de 2 à 4 ans) ont réagi uniquement avec le sous-type H7N7 avec un titre d'anticorps allant du 1/16 à 1/32, et 2 (âgés de 6 à 24 ans) ont réagi non seulement avec le sous-type H7N7 (le titre d'anticorps était compris entre 1/32 et 1/128) mais aussi avec les 2 souches du sous-type H3N8.

Tableau 10 : Titres d'anticorps obtenus par la technique d'Inhibition de l'Hémagglutination (IHA) en fonction de la souche du virus influenza équin (VIE) utilisée.

Souches	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
Russie/1983(H3N8)	43 (14.5%)	39 (13.1%)	31 (10.4%)	43 (14.5%)	5 (1.7%)	3 (1.0%)
Miami/1963(H3N8)	29 (9.8%)	33 (11.1%)	18 (6.1%)	4 (1.3%)	2 (0.7%)	0 (0.0%)
H7N7/Prague/56	1 (0.3%)	3 (1.0%)	0 (0.0%)	1 (0.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)

I.1.1 Séroprévalence du virus grippal chez le cheval en fonction de la technique utilisée

Sur 113 sérums analysés avec le coffret ELISA Flu DETECT® BE, 84 sérums (74.3%) ont été trouvés positifs. Avec le coffret ID Screen® Influenza A Antibody Competition, 38 sérums sur les 184 (20,7%) se sont révélés positifs (Fig. 14).

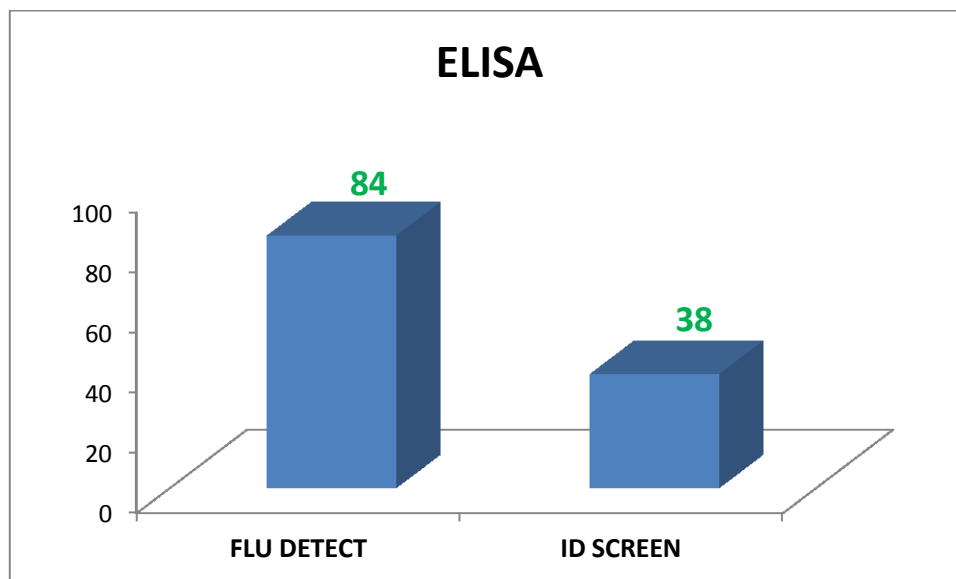


Figure 14 : Nombre de sérums positifs retrouvés dans la population étudiée par ELISA.

Les résultats obtenus avec la souche H3N8/Russie/1983 ont été utilisés pour évaluer la spécificité, la sensibilité et l'agrément des coffrets ELISA. Ainsi, la sensibilité des 2 coffrets ELISA, Flu Detect et ELISA ID Screen, est respectivement de 100% et de 43.5%. Les spécificités relatives sont de 85.3% pour le coffret Flu Detect, 98.9% pour le coffret ID Screen conduisant à un agrément de 95.6% pour le coffret Flu Detect, 73.4% pour le coffret ID Screen (Tableau 11).

Tableau 11 : Comparaison des séroprévalences du virus grippal chez le cheval en fonction de la technique utilisée (Inhibition de l'hémagglutination (IHA) du sous-type Russie/1983 (H3N8) versus ELISA Flu Detect et ELISA ID Screen).

		ELISA			
		Flu Detect		ID Screen	
		Positifs	Négatifs	Positifs	Négatifs
IHA Russie/1983(H3N8)	Positifs	79	0	37	48
	Négatifs	5	29	1	98
Sensibilité (%)		100		43.5	
Spécificité (%)		85.3		98.9	
Agrément (%)		95.6		73.4	

Sensibilité : fréquence des « vrais » positifs (ELISA et IHA positifs); Spécificité : fréquence des « vrais » négatifs (ELISA et IHA négatifs); Agrément : nombre de scores identiques par les 2 méthodes.

I.1.2 Séroprévalence de la grippe équine en fonction de la région

La séroprévalence de la grippe équine est relativement modérée dans les régions de Barika, El-Eulma et Tiaret (Tableau 12), les valeurs s'étendant respectivement de 57.8%, 39% et 67.2% par les tests d'IHA réalisés à l'aide de la souche H3N8/Russie/1983, de 26.6%, 13.3% et 43% pour ceux réalisés avec la souche H3N8/Miami/1963 et de 1.6%, 2.9% et 0.8% pour le sous-type H7N7/Prague/1956. Les résultats obtenus par les tests ELISA sont de 74.3% par le coffret Flu Detect et varient de 14.3% à 31.3% avec le coffret ID Screen. La séroprévalence totale de l'infection virale (détectée par ELISA ID Screen) ($p < 0.01$), de même que celles du sous-type H3N8/Russie/1983 ($p < 0.05$ à $p < 0.001$) et du sous-type H3N8/Miami/1963 ($p < 0.05$ à $p < 0.001$) ont été significativement plus faibles dans la région d'El-Eulma que dans les 2 autres régions. De plus, ces résultats mettent en évidence une différence hautement significative ($p < 0.001$) de la séroprévalence vis-à-vis de la souche H3N8/Russie/1983 et de la souche H3N8/Miami/1963 entre l'Est algérien (régions de Barika et d'El-Eulma) et l'Ouest algérien (région de Tiaret).

Tableau 12 : Séroprévalence de la grippe équine détectée par ELISA ou par Inhibition de l'hémagglutination (IHA) dans les différentes régions algériennes incluses dans cette étude.

Régions	Séropositivité				
	ELISA		IHA		
	Flu Detect	ID Screen	Russie/1983/H3N8	Miami/1963/H3N8	Prague/1956/H7N7
Barika (n = 64)	NT	20/64 (31.3%)	37/64 (57.8%)	17/64 (26.6%)	1/64 (1.6%)
El-Eulma (n = 105)	NT	15/105 (14.3%)	41/105 (39.0%)	14/105 (13.3%)	3/105 (2.9%)
Tiaret (n = 128)	84/113 (74.3%)	3/15 (20.0%)	86/128 (67.2%)	55/128 (43.0%)	1/128 (0.8%)
Total (n = 297)	84/113 (74.3%)	38/184 (20.7%)	164/297 (55.2%)	86/297 (29.0%)	5/297 (1.7%)

NT : non testé.

I.1.3 Séroprévalence de la grippe équine en fonction de l'âge des chevaux

Comme le montre le tableau 13, la séroprévalence globale de la grippe équine est nettement plus élevée chez les chevaux de plus de 10 ans par rapport aux jeunes équidés et ce indépendamment de la méthode d'analyse. Les différences entre les classes d'âge regroupant les jeunes chevaux (de 1 à 3 ans et de 4 à 9 ans) et celles regroupant les chevaux les plus âgés (de 10 à 15 ans et de 16 à 26 ans) variaient de significatives ($p < 0.05$) à hautement significatives ($p < 0.001$).

Tableau 13 : Séroprévalence de la grippe équine détectée par ELISA ou par Inhibition de l'hémagglutination (IHA) en fonction de l'âge des chevaux.

Classes d'âge	Séropositivité				
	ELISA		IHA		
	Flu Detect	ID Screen	Russie/1983/H3N8	Miami/1963/H3N8	Prague/1956/H7N7
1-3 ans (n = 108)	10/27 (37.0%)	1/81 (1.2%)	20/108 (18.5%)	0/108 (0.0%)	1/108 (0.9%)
4-9 ans (n = 117)	26/36 (72.2%)	22/81 (27.2%)	79/117 (67.5%)	34/117 (29.1%)	2/117 (1.7%)
10-15 ans (n = 42)	22/22 (100%)	14/20 (70.0%)	37/42 (88.1%)	28/42 (66.7%)	1/42 (2.4%)
16-26 ans (n = 30)	26/28 (92.9%)	1/2 (50.0%)	28/30 (93.3%)	24/30 (80.0%)	1/30 (3.3%)
Total (n = 297)	84/113 (74.3%)	38/184 (20.7%)	164/297 (55.2%)	86/297 (29.0%)	5/297 (1.7%)

I.1.4 Séroprévalence de la grippe équine en fonction de la race des chevaux

Les résultats de l'influence de la race sont représentés dans le Tableau 14. Le taux de séropositivité a été plus faible chez les races peu représentées comme les chevaux Arabes-barbes (n = 13), Anglo-arabes (n = 3) et Anglo-barbes (n = 4). Aucun équidé de race Anglo-

Arabe (n = 3) n'a présenté d'anticorps dirigés contre le virus de la grippe équine. Les résultats obtenus en IHA à l'aide de la souche de sous-type Russie/1983(H3N8) révèlent une séroprévalence de la grippe équine au sein de la population équine totale étudiée significativement plus élevée dans la race Pur-sang Arabe que dans la race Pur-sang Anglais ($p < 0.01$) et dans les races peu représentées ($p < 0.05$). Il s'avère aussi que, d'après le test IHA réalisé avec la souche Russie/1983(H3N8) dans la région de Tiaret, que le pourcentage d'équidés infectés est plus élevé chez les chevaux de race Barbe, que chez les chevaux des races peu représentées ($p < 0.05$).

Tableau 14 : Séroprévalence de la grippe équine détectée par ELISA ou par Inhibition de l'hémagglutination (IHA) en fonction de la race des chevaux.

Races	Séropositivité				
	ELISA		IHA		
	Flu Detect	ID Screen	Russie/1983/H3N8	Miami/1963/H3N8	Prague/1956/H7N7
PSAr (n = 148)	51/66 (77.3%)	23/82 (28.0%)	94/148 (63.5%)	47/148 (31.8%)	2/148 (1.4%)
PSAn (n = 63)	2/4 (50.0%)	11/59 (18.6%)	28/63 (44.4%)	12/63 (19.0%)	3/63 (4.8%)
Barbe (n = 66)	24/32 (75.0%)	4/34 (11.8%)	34/66 (51.5%)	22/66 (33.3%)	0/66 (0.0%)
Autres (n = 20)	7/11 (63.6%)	0/9 (0.0%)	8/20 (40.0%)	5/20 (25.0%)	0/20 (0.0%)
Total (n = 297)	84/113 (74.3%)	38/184 (20.7%)	164/297 (55.2%)	86/297 (29.0%)	5/297 (1.7%)

PSAr : Pur-sang Arabe ; PSAn : Pur-sang Anglais ; Autres : Arabes-barbes (n = 13), Anglo-arabes (n = 3) et Anglo-barbes (n = 4).

1.1.5 Séroprévalence de la grippe équine en fonction du sexe des chevaux

L'étude de l'influence du sexe sur la séroprévalence de la grippe équine n'a pas mis en évidence de différence significative au sein de la population équine totale de l'étude ou à l'échelle de chacune des 3 régions. Cependant, dans le cas des chevaux de race Pur-sang Arabe, et plus particulièrement pour ceux de la région de Barika, le pourcentage d'équidés infectés a été plus élevé chez les mâles que chez les femelles d'après le test IHA réalisé avec la souche Miami/1963(H3N8) ($p < 0.05$) (Tableau 15).

Tableau 15 : Séroprévalence de la grippe équine détectée par ELISA ou par Inhibition de l'hémagglutination (IHA) en fonction de la région, de la race et du sexe des chevaux.

Facteurs épidémiologiques			Séropositivité				
			ELISA		IHA		
			Flu Detect	ID Screen	Russie/1983/ H3N8	Miami/1963/ H3N8	Prague/195 6/ H7N7
Barika (n = 64)	PSAr (n = 29)	F (n = 16)	NT	37.5% (6/16)	75.0% (12/16)	18.8% (3/16)	0.0% (0/16)
		M (n = 13)	NT	53.8% (7/13)	76.9% (10/13)	53.8% (7/13)	0.0% (0/13)
	PSAn (n = 27)	F (n = 17)	NT	23.5% (4/17)	41.2% (7/17)	17.6% (3/17)	5.9% (1/17)
		M (n = 10)	NT	10.0% (1/10)	40.0% (4/10)	20.0% (2/10)	0.0% (0/10)
	Barbe (n = 5)	F (n = 3)	NT	33.3% (1/3)	66.7% (2/3)	33.3% (1/3)	0.0% (0/3)
M (n = 2)		NT	50.0% (1/2)	50.0% (1/2)	50.0% (1/2)	0.0% (0/2)	
Autres (n = 3)	F (n = 3)	NT	0.0% (0/3)	33.3% (1/3)	0.0% (0/3)	0.0% (0/3)	
El-Eulma (n = 105)	PSAr (n = 44)	F (n = 27)	NT	7.4% (2/27)	37.0% (10/27)	7.4% (2/27)	0.0% (0/27)
		M (n = 17)	NT	29.4% (5/17)	47.1% (8/17)	17.6% (3/17)	5.9% (1/17)
	PSAn (n = 32)	F (n = 20)	NT	25.0% (5/20)	50.0% (10/20)	30.0% (6/20)	10.0% (2/20)
		M (n = 12)	NT	8.3% (1/12)	41.7% (5/12)	8.3% (1/12)	0.0% (0/12)
	Barbe (n = 29)	F (n = 13)	NT	7.7% (1/13)	30.8% (4/13)	0.0% (0/13)	0.0% (0/13)
M (n = 16)		NT	6.3% (1/16)	25% (4/16)	12.5% (2/16)	0.0% (0/16)	
Tiaret (n = 128)	PSAr (n = 75)	F (n = 47)	32/43 (74.4%)	1/4 (25.0%)	34/47 (72.3%)	20/47 (42.6%)	0/47 (0.0%)
		M (n = 28)	19/23 (82.6%)	2/5 (40.0%)	20/28 (71.4%)	12/28 (42.9%)	1/28 (3.6%)
	PSAn (n = 4)	F (n = 1)	1/1 (100%)	NT	1/1 (100%)	0/1 (0.0%)	0/1 (0.0%)
		M (n = 3)	1/3 (33.3%)	NT	1/3 (33.3%)	0/3 (0.0%)	0/3 (0.0%)
	Barbe (n = 32)	F (n = 23)	18/23 (78.3%)	NT	17/23 (73.9%)	14/23 (60.9%)	0/23 (0.0%)
M (n = 9)		6/9 (66.7%)	NT	6/9 (66.7%)	4/9 (44.4%)	0/9 (0.0%)	
Autres (n = 17)	F (n = 14)	5/8 (62.5%)	0/6 (0.0%)	6/14 (42.9%)	5/14 (35.7%)	0/14 (0.0%)	
	M (n = 3)	2/3 (66.7%)	NT	1/3 (33.3%)	0/3 (0.0%)	0/3 (0.0%)	

PSAr : Pur-sang Arabe ; PSAn : Pur-sang Anglais ; Autres : Arabes-Barbes (n = 13), Anglo-Barbe (n = 4) et Anglo-Arabe (n = 3); F : femelle ; M : mâle ; NT : non testé.

I.2 Les résultats virologiques

I.2.1 Chronologie et description du foyer de grippe équine rencontré en 2011 en Algérie

La première suspicion d'une infection par le virus de la grippe équine a été signalée début Mai 2011 à Tiaret. Le virus s'est ensuite propagé aux autres régions du pays (figure 15). L'épizootie, est survenue chez plusieurs propriétaires et les infrastructures concernées hébergeaient plusieurs races de chevaux dont des Pur-Sang. Cet épisode a touché près de 900 chevaux et s'est traduit par l'annulation des courses, dans tout le pays, durant une période de 2 mois. Les signes cliniques associés à l'infection se caractérisaient par des signes évocateurs tels que la pyrexie et la fatigue. Toutefois, peu de chevaux présentaient une légère anorexie. Chez certains équidés l'écoulement nasal est devenu mucopurulent dans un délai de 4 à 5 jours. Les symptômes observés ont disparu après 7 à 10 jours, cependant la plupart des

équidés infectés présentait une toux sèche jusqu'à 3 à 4 semaines après l'apparition des signes cliniques. Les chevaux âgés de 18 mois à 7 ans ont été plus affectés et la morbidité pour ces derniers a été d'environ 100%. En revanche, les chevaux âgés de 1 à 15 mois et ceux âgés de plus de 8 ans ont été moins sensibles à l'infection et la morbidité a été de 10 à 15 % pour les plus jeunes chevaux et de 5% pour les plus âgés. Dans ces catégories d'âge les signes cliniques étaient une toux fréquente avec l'absence de fièvre et de complications.

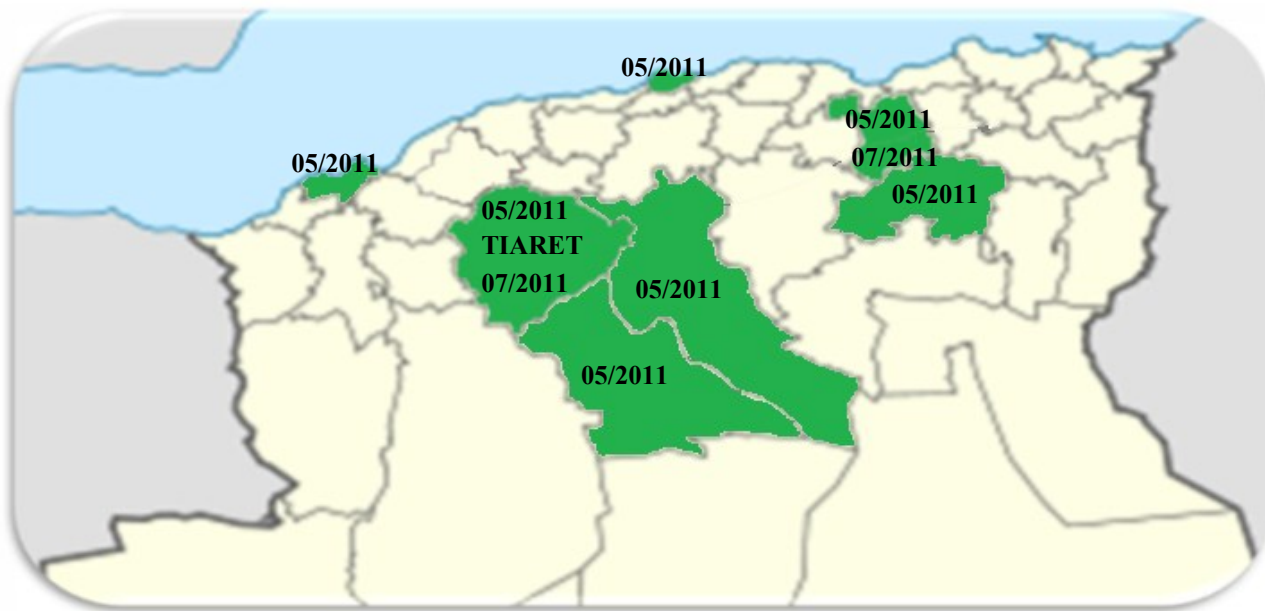


Figure 15: Carte d'Algérie, montrant les régions où se localise la majeure partie de la population équine (90%), et qui sont affectées par la grippe équine (en vert) durant les mois de Mai et Juillet 2011 (Bouaakkaz, communication orale).

I.2.2 Détection du virus et analyse génétique de l'isolat EIV (H3N8) responsable de l'épizootie 2011

L'analyse par qRT-PCR a permis de mettre en évidence la présence de génome viral d'un virus grippal équin, appartenant au sous type H3N8, dans l'ensemble des 12 ENPs prélevés. Cependant, aucun virus infectieux n'a pu être isolé et amplifié par inoculation sur œuf ou par culture cellulaire. L'analyse phylogénétique montre que les 12 isolats appartiennent à la clade 2 du sous-groupe Florida au sein du lignage Américain (figure 16).

Tableau 16: Origine des échantillons

Date	Location	Cheval	Sexe	Age (année)	Race	Positivité par qRT-PCR
Mai 2011	Chaou Chaoua	1	M	6	Barbe	+
		2	M	6	PSAr	+
		3	M	4	PSAr	+
		4	M	3	PSAr	+
		5	M	5	Ar-Barbe	+
		6	M	11	PSAr	+
		7	M	4	PSAr	+
Juillet 2011	Sougueur	8	M	1.5	Barbe	+
		9	M	13	Ar-barbe	+
		10	F	5	Barbe	+
		11	M	1.5	Barbe	+
		12	M	3.5	Barbe	+

PSAr : Pur-sang Arabe ; Ar-barbe: Arabe-Barbe ; F : femelle ; M : mâle

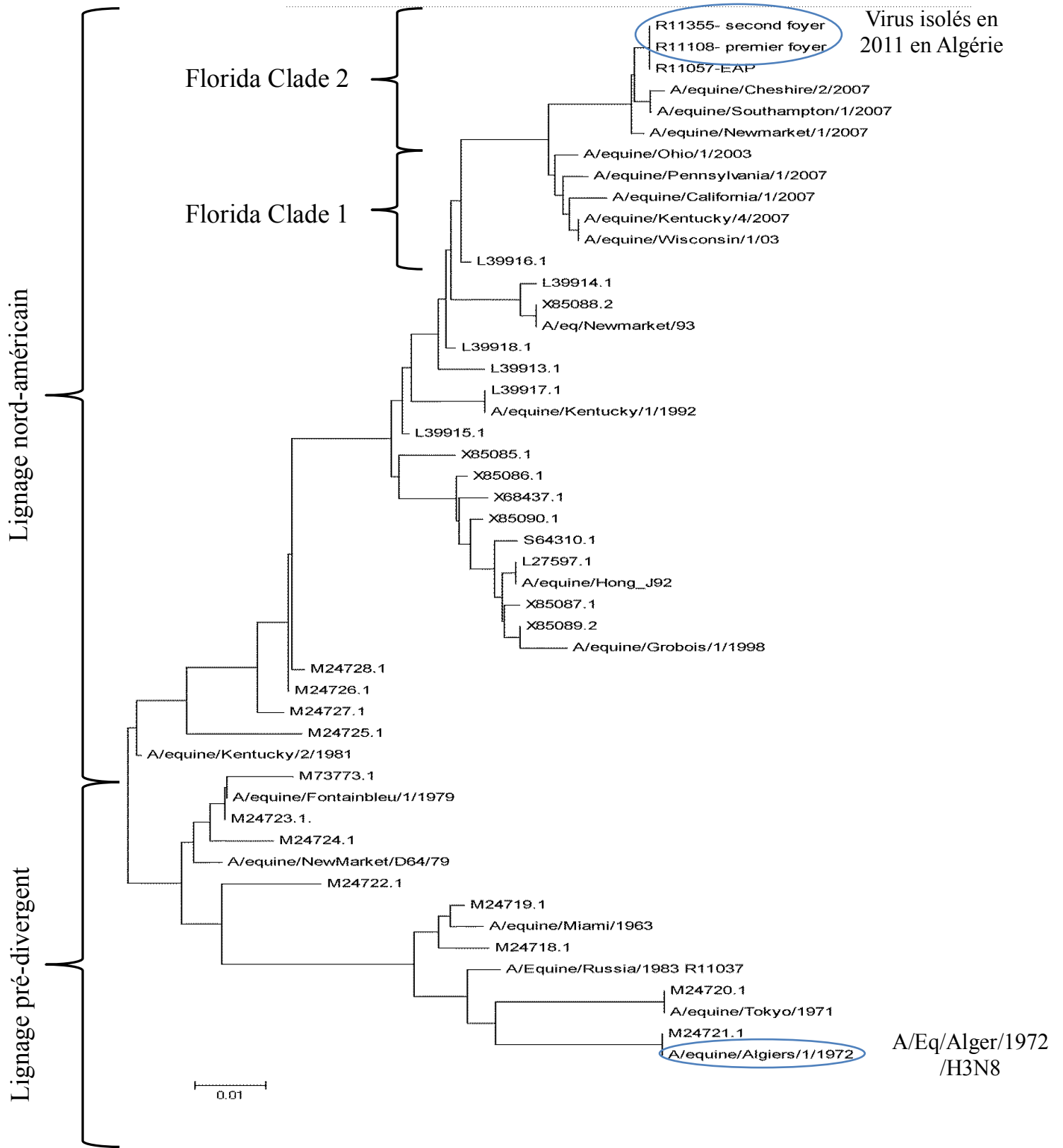


Figure 16: Analyse phylogénétique de la séquence nucléotidique du gène HA des différents virus H3N8 isolés par rapport à l'isolat A/Equine/Tiaret/H3N8/2011.

II. Discussion

Cette étude, a permis de mettre en évidence, pour la première fois depuis les années 70 (WHO, 1972 ; Benmansour et al., 1977a,b), la présence et la circulation du virus de la grippe au sein de la population équine Algérienne.

Les résultats obtenus à l'aide des tests IHA sur les 297 sérums démontrent que 5 (soit 1.7%) sérums réagissent avec le sous-type H7N7. L'origine de ces anticorps n'est pas expliquée, mais comme les sérums proviennent de 5 chevaux importés dont le statut vaccinal est inconnu, il est probable qu'une précédente vaccination soit à l'origine de la présence de ces anticorps circulants. En outre, la faible séroprévalence globale vis-à-vis de ce sous-type et l'absence de ces anticorps chez tous les chevaux nés et élevés en Algérie suggèrent que le sous-type H7N7 ne circulerait plus en Algérie depuis 20 ans, corroborant ainsi les observations réalisées dans d'autres pays (Webster, 1993 ; Damiani et al., 2008; Bryant et al., 2009; Rozek et al., 2009). Il s'agit de la première mise en évidence de la disparition de ce sous-type en Algérie ce qui est en adéquation avec une étude tunisienne parue en 2001 et menée sur 31 chevaux non vaccinés (Chabchoub et al., 2001). La circulation de ce sous-type avait été pour la première fois décrite lors d'une épizootie de grippe équine survenue en Tunisie en 1978-1979 (Ellouze, 1980) durant laquelle la séroprévalence du sous-type 1 était de 65%. La présence du sous-type 1 a été suspectée jusqu'au début des années 90, avec des taux d'anticorps sériques compris entre 7% et 16,9% pour le sous-type H7N7 et compris entre 0,9% et 10% pour le sous-type H3N8 (Boussetta et al., 1994 ; Baazaoui, 1996 ; El Harrak et al., 1998). De plus, des anticorps dirigés contre les sous-types 1 et 2 ont été mis en évidence dans une étude au Mali en 2002 (Sidibé et al., 2002). Au début des années 90, cette persistance de la circulation du sous-type H7N7 a également été démontrée en Europe et aux États-Unis chez des chevaux non vaccinés (Mumford et Wood, 1993 ; Webster, 1993 ; Madic et al., 1996).

Sur les 297 sérums testés, la mise en évidence d'anticorps reconnaissant la souche Miami/1963(H3N8) et la souche Russie/1983(H3N8) par les tests IHA démontre le passage de virus grippaux proches de ces deux sous-types dans les régions étudiées. Ces résultats sont en corrélation avec ceux précédemment obtenus par Benmansour et al. (1977b) qui avaient isolé une souche virale appartenant au sous-type H3N8 lors d'une épizootie d'infection respiratoire aiguë chez les équidés sévissant en Algérie en 1971-1972. Ceci est aussi en adéquation avec les différentes descriptions d'épizooties dans le monde puisque la plupart des virus grippaux équins isolés récemment dans la majeure partie des pays du monde appartiennent au sous-type 2 (Borchers et al., 2005 ; Barbic et al., 2006 ; Martella et al., 2007 ; Muller et al., 2009 ; Rozeka et al., 2009 ; Qi et al., 2010). Le nombre de chevaux positifs étant plus élevé lorsque le test IHA est réalisé avec la souche Russie/1983(H3N8), les titres en anticorps élevés fréquemment obtenus et vu que tous les sérums positifs envers la souche Miami/1963(H3N8) étaient aussi positifs envers la souche Russie/1983(H3N8), il est probable que l'affinité des anticorps soit plus importante envers la souche Russie/1983(H3N8) qu'envers la souche Miami/1963(H3N8). Ainsi, les épitopes de l'hémagglutinine de la souche Russie/1983(H3N8) sont certainement mieux reconnus que ceux de la souche Miami/1963(H3N8). En revanche, comparé aux différentes enquêtes sérologiques déjà menées, le pourcentage de chevaux séropositifs est moyen. Cependant, les deux souches utilisées dans cette étude sont relativement anciennes et il est très peu probable qu'elles circulent encore à l'heure actuelle (Daly et al., 1996 ; Lai et al., 2001). En effet, les souches circulant actuellement dans le monde appartiennent presque exclusivement au lignage américain, cluster Florida (OIE, 2008a ; Bryant et al., 2010 ; Bryant et al., 2011). L'existence d'équidés séropositifs vis-à-vis du sous type H3N8 du virus de la grippe équine met en évidence que les virus grippaux de sous type H3N8 ont circulé, ou circulent encore en Algérie, mais ne donne aucune information quant à l'appartenance phylogénétique des

souches potentiellement circulantes. Une IHA réalisée à l'aide d'une souche appartenant au cluster Florida pourrait être plus adaptée à la recherche d'anticorps dirigés contre des souches isolées dans les années 2000.

Les deux techniques sérologiques utilisées dans cette enquête (IHA et ELISA) détectent à la fois les anticorps post-vaccinaux et les anticorps issus d'infections chez les chevaux et informent sur les souches ayant circulé en Algérie (Dannacher et al., 1977 ; Tizard, 1977 ; Fontaine et Moraillon, 1980 ; Le Minor et Viron, 1982 ; Alzieu et Bichet, 1989 ; Sugaira et al., 1997). Lors de cette enquête, la spécificité relative entre la technique ELISA quel que soit le coffret utilisé et le test IHA réalisé avec la souche Russie/1983(H3N8) est élevée (85.3% pour le coffret Flu Detect et 98.9% pour le coffret ID Screen). En revanche, les sensibilités relatives sont très variables puisqu'elle est de 100% pour le coffret Flu Detect contre 43.5% pour le coffret ID Screen. Ces résultats conduisent à un agrément important pour le coffret Flu Detect (95.6%) mais beaucoup plus modéré pour le coffret ID Screen (73.4%). Ces divergences ne peuvent s'expliquer par les différences de capacités analytiques de chacune de ces techniques, ces tests n'ayant pas été réalisés dans les mêmes conditions. L'agrément important (95.6%) obtenu entre l'identification sérologique du sous-type Russie/1983(H3N8) par le test d'IHA et la technique ELISA par le coffret Flu Detect, associé à une forte spécificité et sensibilité de l'IHA, suggère dans la présente étude que la technique ELISA semble sensible pour la mise en évidence d'une réponse sérologique dirigée contre la grippe équine, ce qui est en accord avec les résultats d'Adeyefa et al. (1996) et de Sugiura et al. (2001). Cette constatation reste à confirmer par une analyse de nos échantillons par une souche du sous type 2 appartenant au lignage Américain et plus particulièrement au sous lignage Floride.

Cette enquête séro-épidémiologique montre que le taux d'équidés infectés est significativement moins élevé pour les chevaux stationnés dans la région d'El-Eulma par

rapport à ceux stationnés dans les régions de Tiaret et de Barika. De même, la séroprévalence de la grippe équine évaluée par IHA à l'égard de la souche Russie/1983(H3N8) est significativement plus fréquente dans l'Ouest (région de Tiaret) que dans l'Est algérien (El-Eulma et surtout Barika). Ces disparités dans la séroprévalence de la grippe équine sur le territoire algérien pourraient être liées non seulement à la densité de la population équine dans chacune des régions (une forte densité de population favorisant la circulation virale comme dans le cas de la région de Tiaret) mais aussi à la circulation des souches virales dans les pays frontaliers, en particulier en Tunisie située à l'Est et au Maroc située à l'Ouest.

En dépit des disparités des nombres des sérums collectés par tranche d'âge dans la présente étude, il existe une forte corrélation positive entre l'âge et le degré de réceptivité des animaux à la maladie. Les animaux les plus âgés (de 16 à 26 ans) étaient souvent les plus infectés (93.3% de séropositifs), ce qui est pleinement en accord avec les travaux antérieurs de Barquero et al. (2007) et ceux de Newton et al. (2006). En revanche, Boussetta et al. (1994) et Sidibé et al. (2002) ont observé une forte hétérogénéité de la fréquence des animaux séropositifs en fonction de l'âge. D'après Nyaga et al. (1980), les taux de séroprévalence seraient nettement plus bas chez les jeunes équidés (de moins de 2 mois) et chez les animaux âgés de plus de 10 ans que chez ceux âgés de 6 mois à 7 ans. Selon Waldeman et al. (1934), les jeunes chevaux seraient plus sensibles à l'infection grippale. D'autre part, Newton et al. (1999, 2000) n'ont observé aucun effet significatif de l'âge sur la séroprévalence de la grippe équine. Chez les chevaux âgés non vaccinés, la protection vis-à-vis des pathologies équines serait plus efficace en raison du développement d'une immunité acquise (Newton et al., 2006). Dans la présente étude, la forte prévalence des anticorps antigrippaux chez les chevaux de plus de 16 ans prouve l'existence d'une infection virale ancienne par le sous-type 2 (H3N8) ayant largement circulé au sein de la population équine durant les 15-20 dernières années, probablement là où les souches responsables de ces infections virales sont plus

proches antigéniquement de la souche Russie/1983(H3N8). Le faible taux d'équidés séropositifs âgés entre 1 et 3 ans pourrait être principalement lié à une circulation virale de faible amplitude dans les régions algériennes étudiées durant ces 3 dernières années. Néanmoins, il est important de souligner que, depuis les années 2000, les virus influenza issus du lignage américain sont les principaux responsables des épizooties dans le monde. Or, les souches utilisées pour l'IHA sont génétiquement et antigéniquement assez éloignées des souches de lignage américain et leur efficacité pour détecter des anticorps dirigés contre ces dernières peut en être amoindrie (Oxburgh et al., 1994 ; Oxburgh et Klingeborn, 1999 ; Manguerra et al., 2000 ; Borchers et al., 2005 ; Martella et al., 2007).

D'après Nyaga et al. (1980), l'appartenance à la race quarter constitue un facteur de risque important à l'égard de l'infection virale alors que les races pur-sang seraient nettement protégées. Il ressort de notre étude qu'une sensibilité à l'égard du virus influenza équin est significativement associée à la race. La séropositivité des chevaux de race Pur-sang Arabe, sans considérer l'origine géographique des animaux dans un premier temps, vis-à-vis de la souche Russie/1983(H3N8) est plus élevée que celle des chevaux de race Pur-sang Anglais et des races peu représentées. Il apparaît aussi, dans cette enquête, que les chevaux Barbes, notamment ceux de la région de Tiaret (Ouest algérien) possèdent plus d'anticorps reconnaissant la souche Russie/1983(H3N8) que les races peu représentées. Ces résultats confirment ceux obtenus par Ellouze (1980) et Boussetta et al. (1994) qui ont également observé une sensibilité accrue des chevaux barbes à l'infection grippale comparée à celle des chevaux pur-sang.

Selon Nyaga et al. (1980), le sexe ne constituerait pas un facteur de risque de l'infection grippale. De même, sur l'ensemble des échantillons de la population équine étudiée, les 2 sexes présentent des taux de séropositivité comparables quelle que soit la technique.

L'analyse par qRT-PCR a permis de confirmer la présence du virus de la grippe équine, dans l'ensemble des 12 ENPs prélevés. Cette technique s'est révélée plus sensible pour la détection d'échantillons positifs que l'isolement du virus sur œufs embryonnés ou en culture cellulaire, la détection de l'antigène par DFA, la détection de la nucléoprotéine par ELISA ou la sérologie (Quinlivan et al., 2004, 2005; Legrand et al., 2008; Bryant et al., 2010). Cependant, aucun virus infectieux n'a pu être amplifié par inoculation sur œufs embryonnés ou sur culture cellulaire. Cet échec peut être expliqué par la longue conservation des ENPs à -20°C (3 mois) avant isolement ce qui aurait altéré le pouvoir infectieux des virus grippaux présents dans ces ENPs. En effet, ces dernières années plusieurs laboratoires du monde rapportent des difficultés pour isoler le sous-type H3N8 du virus de la grippe équine à partir d'écouvillons qui ont fourni des résultats positifs avec d'autres méthodes de détection (Newoton et al., 1999). La collection en temps opportun et la bonne conservation des écouvillons nasopharyngés sont nécessaires pour isoler le virus et la surveillance des virus pour la dérive antigénique. Cette dernière est essentielle pour la surveillance de la grippe et la mise à jour des vaccins (Foord et al., 2009; Gildea et al., 2011).

L'étude réalisée par Benmansour et al. (1977a,b) durant l'épizootie d'infection respiratoire aiguë des équidés qui a sévi en Algérie en 1971-72, avait permis d'isoler deux souches appartenant au sous-type H3N8. Depuis cette date, aucune donnée sur la circulation du virus de la grippe équine en Algérie n'a été publiée. Selon les enquêtes de terrain réalisées auprès des vétérinaires cliniciens de nombreux haras, l'Algérie aurait connu deux épizooties d'infection respiratoire aiguë des équidés en 1998 et en 2005 mais aucune recherche ou analyse de confirmation de l'agent responsable de ces épisodes respiratoires n'a été réalisée. Le virus grippal de sous-type H3N8 a été à l'origine d'épizooties de grippe équine au Maroc en 1997, en Égypte en 2000 et en 2008, au Nigeria en 1991 et en Afrique du sud en 1986 et 2003 respectivement (Kaddissi et al., 1998; Abd El-Rahim and Hussain, 2004;

<http://www.oie.int>; Adeyefa and McCauley, 1994; Guthrie et al., 1999; Guthrie, 2006). Daly et al. (1996) ont classé les virus H3N8 en deux lignages distincts: Américain et Eurasien. De plus, Lai et al., (2001) ont classé les isolats du lignage Américain en trois groupes appelés groupe Argentin, Kentucky et Florida. Les virus du groupe Floridien avec les séquences de l'hémagglutinine divergentes ont été provisoirement regroupés dans les Clades 1 et 2 (OIE, 2008a).

Afin de caractériser le virus responsable de l'épizootie de Tiaret en 2011, le génotypage des isolats a été entrepris par séquençage du gène codant pour l'hémagglutinine (HA). L'analyse phylogénétique a montré que les isolats de grippe équine algériens appartiennent tous au lignage américain, groupe Florida, Clade 2. Le séquençage du gène HA des isolats des virus responsables de l'épizootie de grippe équine qui a sévi en Algérie en 1971-72 démontre que le virus A/Equine/Algiers/6/71 est étroitement apparenté à A/Equine/Hong-Kong/157/71 et à A/Equine/Hungary/2/71, et le virus A/Equine/Algiers/1/72 se trouve groupé avec les isolats A/Equine/Tokyo/1/71 (pré divergent), ont été largement différents de l'épizootie actuelle. L'étude réalisée par Bryant et al. (2011) sur les virus isolés dans la période 2008-09, démontre que la majorité des EIVs circulant en Europe appartiennent au sous-groupe Floridien Clade 1 et 2 tandis que ceux circulant en Amérique du Nord, ils appartiennent au sous-groupe Floridien Clade 1. Les virus responsables des épizooties récentes en 2007 au Japon et en Australie, et en 2008 en Égypte sont apparentés aux virus appartenant au sous-lignage Floridien Clade 1 au sein du groupe Américain (Callinan, 2008 ; Yamanaka et al., 2008 ; <http://www.oie.int>). Les virus isolés en Mongolie 2008, en Chine 2007-08 et en Inde 2008-09 ont été classés en clade 2 du sous lignage Floridien (Qi et al., 2010 ; Virmani et al., 2010 ; Wei et al., 2010). Tous les virus isolés et caractérisés en Irlande entre 2007 et 2010 sont apparentés aux virus appartenant au sous-lignage Floridien Clades 1 et 2 (Gildea, 2011). Les virus isolés en 2010 en France et au

Royaume-Uni correspondaient tous au clade 2. Ainsi, le virus isolé chez le cheval exporté de Belgique vers le Japon était également un virus de clade 2 (OIE, 2011).

Dans le cadre de cette épizootie de Tiaret 2011, les chevaux âgés de plus de 8 ans paraissent moins sensibles à l'infection (morbidity 5%). Ce ci laisse supposer le développement d'une immunité acquise contre une infection virale naturelle ancienne par le virus H3N8 ayant largement circulé au sein de la population équine durant les dernières années, probablement là où les souches responsables de ces infections virales sont plus proches antigéniquement de la souche détectée à Tiaret en 2011 (H3N8). Il se pourrait que ces chevaux aient été réinfectés par la même souche si on considère que le virus de la grippe équine est le responsable des épizooties d'infections respiratoires aiguës en 1998 et en 2005. Chez les chevaux âgés non vaccinés, la protection vis-à-vis des pathologies équines serait plus efficace en raison du développement d'une immunité acquise (Newton et al., 2006). L'infection naturelle par le virus EIV confère une immunité de longue durée qui protège l'animal contre une réinfection par le même type de virus en réduisant, la gravité des signes cliniques et l'excrétion virale (Hannant et al., 1988; Paillot, 2006). Le faible taux de chevaux infectés âgés entre 1 et 15 mois (morbidity 10 – 15 %) pourrait être dû principalement à une immunité passive conférée par les anticorps maternels, ainsi tous les poulains de l'étude sont nés dans le même site et issus de mères âgées (plus de 8 ans). Toutefois, la durée de persistance des anticorps maternels des poulains est controversée (Liu et al., 1985 ; Van Maanen, 1992), mais les anticorps spécifiques contre la grippe équine diminuent en général à un niveau faible, mais détectable à l'âge de 6 mois (Cullinane et al., 2001 ; Wilson et al., 2001). Dans cette épizootie, la morbidity élevée (100 %) observée vis-à-vis du virus de la grippe équine chez les chevaux âgés entre 18 mois et 7 ans, prouve l'exposition de cette tranche d'âge de chevaux à une nouvelle infection par le sous-type H3N8, soit il s'agit de chevaux naïfs à la grippe équine qui ont été infectés pour la première fois, ou probablement de

chevaux réinfectés par la même souche détectée à Tiaret en 2011 (H3N8) si on considère que le virus de la grippe équine est le responsable de l'épizootie d'infection respiratoire aiguë durant 2005.

Les périodes d'augmentation du risque de la propagation du virus de la grippe équine associées à la saison et l'augmentation des mouvements de chevaux, ont été identifiées antérieurement par Newton et al., (1999). Dans cette étude, la grippe équine a été confirmée dans 2 endroits après le mouvement de chevaux entre les différentes régions principalement dans les saisons d'été et de printemps. Dans les endroits où il n'y n'avait aucun mouvement et de contact de chevaux, il n'y a aucune propagation de la maladie. Une étude par Morley et al., (2000) a identifié la fréquence du contact direct comme étant un facteur de risque majeur de la grippe.

En Algérie, la vaccination contre la grippe équine n'est pas obligatoire. Aucun signe clinique n'a été observé dans des endroits où il y a les chevaux vaccinés contre la grippe. Dans cette étude, aucune preuve de rupture de la vaccination de la grippe équine, le virus a été détecté uniquement chez les animaux non vaccinés contre la grippe équine. Des vaccins à virus vivants ayant été à l'origine d'épizooties de grippe équine, ont été signalés lors de l'usage de souches Européennes (Martella et al., 2007 ; Barbic et al., 2009).

Conclusion

Conclusion

La caractérisation et le suivi génétique du virus de la grippe équine sont des éléments essentiels pour essayer de réduire le potentiel épizootique de la maladie. Connaître le sous-type circulant dans un pays, permet la mise en œuvre d'une prophylaxie adaptée afin de prévenir le phénomène et d'utiliser des vaccins composés de souches qui provoqueront une réaction immunitaire capable de lutter contre le virus circulant sur le territoire. Ainsi, un typage des deux protéines les plus immunogènes, l'hémagglutinine et la neuraminidase, est régulièrement réalisé pour étudier l'évolution du virus et surveiller l'apparition d'un nouveau variant ou la persistance d'un ancien. De plus, la mise sur le marché de vaccins de nouvelle génération permet d'instaurer une immunité plus proche de celle induite par les souches sauvages.

Les résultats sérologiques et de séquençage montrent que le virus de la grippe équine de sous type H3N8 circule en Algérie, contrairement aux virus de sous-type H7N7 qui, comme dans le reste du monde, ne semblent pas être présents puisque les 5 sérums retrouvés positifs en IHA étaient issus de chevaux importés dont le statut vaccinal est inconnu. Cette étude décrit, pour la première fois depuis 1972, la détection et la caractérisation génétique du virus de la grippe équine (A/equine/H3N8/Tiaret/2011) sur le territoire Algérien. Les résultats de cette étude ont permis d'obtenir des informations épidémiologiques détaillées sur la circulation du virus de la grippe au sein de la population équine en Algérie. Ces données permettront d'élaborer des stratégies de dépistage, de prévention et de contrôle efficaces de la grippe équine en Algérie. La mise en œuvre d'un programme national de vaccination contre la grippe équine, à l'aide d'un vaccin moderne et efficace contre le sous-type 2 du virus de la grippe équine, semble essentielle en Algérie.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Acha, P.N., Szyfres, B., 2003.

Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. Volume 2.
Chlamydiosis, rickettsioses and viroses. 3rd ed.
Scientific and Technical Publication, PAHO, Washington DC., 580, 235-45.

2. Adams, C. W., 1959.

Postviral myopericarditis associated with the influenza virus; report of eight cases.
Am. J. Cardiol., 4 (1), 56-67.

3. Adeyefa, C.A.O., Hamblin, C., Cullinane, A.A., McCauley, J.W., 1996.

Nationwide serological survey of equine influenza in Nigeria
Revue. Élev. Méd. Vét. Pays Trop., 49 (1), 24 - 27.

4. Alzieu, J.P., Bichet, H., 1989.

Réflexions sur la grippe équine et la rhinopneumonie équine. Moyens de contrôle.
Revue. Méd. Vét., 140, 1097-1107.

5. Anestad, G., Maagaard, O., 1990.

Rapid diagnosis of equine influenza
Vet. Rec., 126, 550–551.

6. Animal Health, Australia, 2007.

Disease strategy: Equine influenza (Version 3.0). Australian Veterinary Emergency
Plan AUSVETPLAN), 3ed. Primary Industries Ministerial Council, Canberra,
ACT. <http://www.animalhealthaustralia.com.au>.

7. Anna, R.S., 2007.

Influenza in: Animal Disease Factsheets.
Ithaca, [NY, IVIS \(www.ivis.org\)](http://www.ivis.org)., pp. 23.

8. Art, T., de Moffarts, B., Van Erck, E., Becker, M., Bedoret, D., Lekeux, 2005.

Administration par inhalation de marbofloxacin chez le cheval sain, effets sur la fonction respiratoire

Conférence AVEF, Angers.

9. Ataseven, V.S., Daly, J.M., 2007.

Seroepidemiology of Equine Influenza Virus Infection in Turkey

Turk. J. Vet. Anim. Sci., **31**, 199-202

10. Baazaoui, S., 1996.

Contribution à l'étude de la rhino-pneumonie, de la grippe équine et de l'anémie infectieuse des équidés dans la région du centre tunisien.

Thèse. Doct. Méd. Vét., ENMV, Sidi-Thabet, Tunisie, 98 pages.

11. Bancroft, C.T., Parslow, T.G., 2002.

Evidence for segment-nonspecific packaging of the influenza A virus genome

J. Virol., **76**(14), 7133–9.

12. Barbic, L., Daly, J.M, Rudan, N., Kovac, S., Savic, V., Cvetnic, S., Madic, J., 2006.

An outbreak of equine influenza (H3N8) in Croatia in 2004 caused by South American lineage.

Rad 496., Medicinske. znanost., **30**, 63 – 71.

13. Barbic, L., Madic, J, Turk, N., Daly, J., 2009.

Vaccine failure caused an outbreak of equine influenza in Croatia.

Vet. Microbiol., **133**, 164-71.

14. Barquero, N., Daly, J.M., Newton, J.R., 2007.

Risk factors for influenza infection in vaccinated racehorses: Lessons from an outbreak in Newmarket, UK in 2003.

Vaccine., **25**, 7520-7529.

15. Barrier, I., Grobois, F., 2006.

La grippe équine

Fiches Techniques, Pathologies et Maladies, Librairie des Haras Nationaux, France., 2 pages.

16. Beard, C.W., 1998.

Avian influenza. In: Richmond, V.A.: Foreign animal diseases.

US. Anim. Health Asso., pp. 71-80.

17. Beech, J., 1991.

Infections caused by viruses, In Beech J (ed): Equine Respiratory Disorders.

Lea and Febiger, Philadelphia, PA., pp. 153 – 180.

18. Benmansour, A., Benelmouffok, A., Bouguermouh, A., 1977a.

Epizootie de grippe équine due à un nouveau variant des myxovirus équin du sous-type 2. I. Etiologie.

Arch. Inst. Past. Algérie., **52**, 105 – 110.

19. Benmansour, A., Benelmouffok, A., Bouguermouh, A., 1977b.

Epizootie de grippe équine due à un nouveau variant des myxovirus équin du sous-type 2. I. Epizootiologie.

Arch. Inst. Past. Algérie., **52**, 111 – 118.

20. Binns, M.M., Daly, J.M., Chirnside, E.D., 1993.

Genetic and antigenic analysis of an equine influenza H3 isolate from the 1989 epidemic. *Arch Virol.*, **130**, 33-43.

21. Birch-Machin, I., Roawn, A., Pick, J., Mumford, J., Binns, M., 1997.

Expression of the nonstructural protein NS1 of equine influenza A virus: detection of Anti-NS1 antibody in post infection equine sera.

J. Virol. Meth., **65**, 255-263.

22. Bonnie R., Tim M., 2004.

Equine Respiratory Diseases

Blackwell Publishing Company., 344 pages.

23. Borchers, K., Daly, J., Stiens, G., Kreling, K., Kreling, I., Ludwig, H., 2005.

Characterisation of three equine influenza A H3N8 viruses from Germany (2000 and 2002): Evidence for frozen evolution.

Vet. Microbiol., **107**, 13–21.

24. Bouman, A., Heineman, M.J., Faas, M.M., 2005.

Sex hormones and the immune response in humans

Hum. Reprod. Update., **11**, 411–23.

25. Bousseta, M., Chabchoub, A., Ghram, A., Jomaa, I., Ghorbel, A., Aouina, T., Ben Amor, H., 1994.

Enquête séroépidémiologique sur la grippe équine et l'anémie infectieuse des équidés dans le Nord-Est tunisien.

Revue. Elev. Méd.Vét. Pays Trop., **47**, 277-281.

26. Bouvier, N.M., Palese P., 2008.

The biology of influenza viruses.

Vaccine., **26**, 49 – 53.

27. Breathnach, C.C., Clark, H.J., Clark, R.C., Olsen, C.W., Townsend, H.G.G., Lunn, D.P., 2006.

Immunization with recombinant modified vaccinia Ankara (rMVA) constructs encoding the HA or NP gene protects ponies from equine influenza virus challenge.

Vaccine., **24**, 1180 –1190.

- 28. Bryant, N.A., Rash, A.S., Russell, C.A., Ross, J., Cooke, A., Bowman, S., MacRae, S., Lewis, N.S., Paillot, R., Zanoni, R., Meier, H., Griffiths, L.A., Daly, J.M., Tiwari, A., Chambers, T.M., Newton, J.R. and Elton, D.M., 2009.**
Antigenic and genetic variations in European and North American equine influenza virus strains (H3N8) isolated from 2006 to 2007.
Vet. Microbiol., **138**, 41-52.
- 29. Bryant, N.A., Paillot, R., Rash, A.S., Medcalf, E., Montesso, F., Ross, J., Watson, J., Jeggo, M., Lewis, N.S., Newton, J.R., Elton, D.M., 2010.**
Comparison of two modern vaccines and previous influenza infection against challenge with an equine influenza virus from the Australian 2007 outbreak
Vet. Res., **41**, 19.
- 30. Bryant, N.A., Rash, A.S., Woodward, A.L., Medcalf, E., Helweggen, M., Wohlfender, F., Cruz, F., Herrmann, C., Borchers, K., Tiwari, A., Chambers, T.M., Newton, J.R., Mumford, J.A., Elton, D.M., 2011.**
Isolation and characterisation of equine influenza viruses (H3N8) from Europe and North America from 2008 to 2009.
Vet. Microbiol., **147**, 19-27.
- 31. Callinan, I., 2008.**
Equine Influenza: The August 2007 outbreak in Australia.
Commonwealth of Australia., [http:// www.equineinfluenzainquiry.gov.au](http://www.equineinfluenzainquiry.gov.au).
- 32. Carr, C.M., Kim, P. S., 1993.**
A spring-loaded mechanism for the conformational change of influenza hemagglutinin
Cell., **73** (4), 823-832.
- 33. Carter, G.R., Wise, D.J., 2006.**

Orthomyxoviridae. In: A Concise Review of Veterinary Virology. Carter G.R. and Wise D.J. (Eds.).

Ithaca NY, IVIS, www.ivis.org

34. Centers for Disease Control and Prevention (CDC)., 2007.

Avian flu

<http://www.cdc.gov/flu/avian/index.htm>.

35. Chabchoub, A., LandolsI, F., Zientara, S., Amira, A., Mejri, M., Ghorbel, A., Ghram, A., 2001.

À propos d'une épizootie de grippe équine survenue en Tunisie.

Archs. In s t. Pasteur. Tunis., **78**, 69–73.

36. Chambers, T.M., Holland, R.E., Lai, A.C.K., 1995.

Equine influenza - current veterinary perspectives, part 2

Equine Practice., **17**, 26-30.

37. Chambers, T.M., Shortridge, K.F., Li, P.H., Powell, D.G., Watkins, K.L., 1994.

Rapid diagnosis of equine influenza by the Directigen FLU-A enzyme immunoassay.

Vet. Rec., **135**, 275-279.

38. Christine, M., David Wilson, W., 2006.

Equine Influenza Virus

Clin. Tech. Equine Pract., **5**, 187-196.

39. Chunli, Wu., Xiaowen, C., Jianfan, H., Xing, L., Jingwen, W., Riqiang, D., Qingxing, L., Xunzhang, W., 2008.

A multiplex real-time RT-PCR for detection and identification of influenza virus types A and B and subtypes H5 and N1

J. Virol. Meth., **148**, 8–88

40. Coggins, L., 1979.

Viral respiratory disease

Vet. Clin. North. Am. Large. Anim. Pract., **1**, 59-72.

41. Colman, P. M., 1994.

Influenza virus neuraminidase: structure, antibodies, and inhibitors.

Protein Sci., **3** (10), 1687-1696

42. Cook RF, Sinclair R, Mumford JA. 1988.

Detection of influenza nucleoprotein antigen in nasal secretions from horses infected with A/equine influenza (H3N8) viruses.

J. Virol. Meth., **20**, 1-12.

43. Cowled, B., Ward, M.P., Hamilton, S., Garner, G., 2009.

The equine influenza epidemic in Australia: spatial and temporal descriptive analyses of a large propagating epidemic.

Prev. Vet. Med., **92**, 60–70.

44. Crawford, P.C., Dubovi, E.J., Castleman, W.L., 2005.

Transmission of equine influenza virus to dogs

Science., **310**, 482-485.

45. Cros, J.F., Palese, P., 2003.

Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses

Virus Res., **95**, 3–12.

46. Crouch, C.F., Daly, J., Hannant, D., Wilkins, J., Francis, M.J., 2004.

Immune responses and protective efficacy in ponies immunised with an equine influenza ISCOM vaccine containing an 'American lineage' H3N8 virus.

Vaccine., **23**, 418-425.

- 47. Crouch, C.F., Daly, J., Henley, W., Hannant, D., Wilkins, J., Francis, M.J., 2005.**

The use of a systemic prime/mucosal boost strategy with an equine influenza ISCOM vaccine to induce protective immunity in horses.

Vet. Immunol. Immunopathol., **108**, 345-355.

- 48. Cullinane, A., Weld, J., Osborne, M., Nelly, M., McBride, C., Walsh, C., 2001.**

Field studies on equine influenza vaccination regimes in thoroughbred foals and yearlings. *Vet. J.*, **161**, 174-185.

- 49. Daly, J.M., Lai, A.C., Binns, M.M., Chambers, T.M., Barrandeguy, M., Mumford, J.A., 1996.**

Antigenic and genetic evolution of equine H3N8 influenza A viruses

J. Gen. Virol., **77**, 661-671

- 50. Daly, J.M., Mumford, J.A., 2001.**

Influenza Infections in: Lekeux, P., (eds.) Equine Respiratory Diseases.

Ithaca NY, IVIS, http://www.ivis.org/special_books/Lekeux/toc.asp.

- 51. Daly, J.M., Yates, R.J., Browse, G., Swann, Z., Newton, J.R., Jessett, D., Davis-Poynter, N., Mumford, J.A., 2003.**

Comparison of hamster and pony challenge models for evaluation of effect of antigenic drift on cross protection afforded by equine influenza vaccines

Equine Vet. J., **35**, 458-462.

- 52. Daly, J.M., Newton, J.R., Mumford, J.A., 2004.**

Current perspectives on control of equine influenza.

Vet. Res., **35**, 411-423.

- 53. Daly, J. M., Whitwell, K. E., Miller, J., Dowd, G., Cardwell, J. M., Smith, K. C., 2006.** Investigation of equine influenza cases exhibiting neurological disease: coincidence or association?
J. Comp. Pathol., **134**, 231-235.
- 54. Daly, J.M., Blunden, A.S., Macrae, S., Miller, J., Bowman, S.J., Kolodziejek, J., Nowotny, N., Smith, K.C., 2008.**
Transmission of equine influenza virus to English foxhounds.
Emerg. Infect. Dis., **14**, 461–464.
- 55. Damiani, A.M., Scicluna, M.T., Ciabatti, I., Cardeti, G., Sala, M., Vulcano, G., Cordioli, P., Martella, V., Amaddeo, D., Autorino, G.L., 2008.**
Genetic characterization of equine influenza viruses isolated in Italy between 1999 and 2005. *Virus Res.*, **131**, 100-105.
- 56. Dannacher, G., Coudert, M., Fedida, M., Perrin, M., 1977.**
La grippe équine : étude quantitative de l'état immunitaire post-vaccinal et des corrélations entre ses différents aspects.
Revue. Méd. Vét. **128**, 323-341.
- 57. Donofrio, J.C., Coonrod, J.D., Chambers, T.M., 1994.**
Diagnosis of equine influenza by the polymerase chain reaction
J. Vet. Diagn. Invest., **6**, 39-43.
- 58. El Harrak, M., Hmidouch, A., Chkri, A., Ouragh, L., Akkari, A., 1998.**
Epidemiology of equine influenza in Morocco
Proc. 8th Int. Conf. Equine Infectious Diseases. Dubai, United Arab Emirates., pp. 540-542.
- 59. Ellouze, M.R., 1980.**

Contribution à l'étude épidémiologique de l'anémie infectieuse, de l'artérite à virus, de la rhinopneumonie et de la grippe équine en Tunisie.

Thèse Doct. Vét., ENMV, Sidi-Thabet, Tunisi, 69 pages.

60. Etienne, T., 2006.

Virologie clinique. Collection virologie clinique.

Point Vét., pp. 21 – 28.

61. Edlund Toulemonde C., Daly J., Sindler T., Guigal P.M., Audonnet J.C., Minke J.M., 2005.

Efficacy of a recombinant equine influenza vaccine against challenge with an American lineage H3N8 influenza virus responsible for the 2003 outbreak in the United Kingdom.

Vet. Rec., **156**, 367-371.

62. Fenner, F., Bachmann, P.A., Gibbs, E.P.J., Murphy, F.A., Studdert, M.J., White, D.O., 1987.

Veterinary virology, Orthomyxoviridae.

Academic. Press. Inc. San Diego, California, USA., pp. 473-84.

63. Fontaine, M., Moraillon, A., 1980.

Considérations sur l'épizootie de grippe 1978-79 en France.

Rec. Méd. Vét., **156** (2), 139-145.

64. Foord, A.J., Selleck, P., Colling, A., Klippel, J., Middleton, D., Heine H.G., 2009.

Real-time RT-PCR for detection of equine influenza and evaluation using samples from horses infected with A/equine/Sydney/2007 (H3N8).

Vet. Microbiol., **137**, 1-9.

- 65. Fouchier, R.A., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T.M., Herfst, S., Smith, D., Rimmelzwaan, G.F., Olsen, B., Osterhaus, A.D., 2005.**
Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls.
J. Virol., **79**, 2814-2822.
- 66. Frederick, A.M., Paul, E., Gibbs, J., Marian, C.H., Michael, J.S., 2008.**
Veterinary Virology (3 ed.)
Academic Press. San Diego, California, USA., 641 pages.
- 67. Fujii, Y., Goto, H., Watanabe, T., Yoshida, T., Kawaoka, Y., 2003.**
Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **100** (4), 2002–7.
- 68. Fujimiya, Y., Perryman, L.E., Crawford, T.B., 1979**
Leukocyte cytotoxicity in a persistent virus infection: presence of direct cytotoxicity but absence of antibody-dependent cellular cytotoxicity in horses infected with equine infectious anemia virus.
Infect. Immun., **24**, 628-636.
- 69. Fynan, E.F., Webster, R.G., Fuller, D.H., Haynes, J.R., Santoro, J.C., Robinson, H.L., 1993.**
DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **90**, 11478-11482.
- 70. Galan, J.E., Timoney, J.F., Lengemann, F.W., 1986**
Passive transfer of mucosal antibody to *Streptococcus equi* in the foal
Infect. Immun., **54**, 202-206.
- 71. Gerber, H., 1969.**

Clinical features and therapy of chronic pulmonary diseases in the horse

Dtsch. Tierarztl. Wochenschr., **76** (9), 234-239.

72. Gildea, S., Arkins, S., Cullinane, A., 2011.

Management and environmental factors involved in equine influenza outbreaks in Ireland 2007–2010.

Equine Vet. J. **43**, 608-17.

73. Guo, Y., Wang, M., Kawaoka, Y., Gorman, O., Ito, T., Saito, T., Webster, R.G., 1992

Characterization of a new avian-like influenza A virus from horses in China.

Virology., **188**, 245-255.

74. Guo, Y., Wang, M., Zhang, G.S., Li, W.K., Kawaoka Y., Webster, R.G., 1995

Seroepidemiological and molecular evidence for the presence of two H3N8 equine influenza viruses in China in 1993-94

J. Gen. Virol., **76**, 2009 - 2014

75. Guthrie, A.J., 2006.

Guthrie - equine influenza in South Africa, 2003 outbreak

Proc. WEVA. 9th Int. Cong. Marrakech. Morocco., pp. 92–94.

76. Hannant, D., Jessett, D.M., O'Neill, T., Sundquist, B., Mumford, J.A., 1987.

Nasopharyngeal, tracheobronchial, and systemic immune responses to vaccination and aerosol infection with equine-2 influenza A virus (H3N8), In: Powell, D.G. (Ed.) *Equine Infectious Diseases V*.

Proc. 5th Int. Conf. University Press of Kentucky, Lexington, KY., pp. 66-73.

77. Hannant, D., Mumford, J.A., Jessett, D.M., 1988.

Duration of circulating antibody and immunity following infection with equine influenza virus

Vet. Rec., **122**, 125-128.

78. Hannant, D., Jessett, D.M., O'Neill, T., Livesay, G.J., Mumford, J.A., 1994

Cellular immune responses stimulated by inactivated virus vaccines and infection with equine influenza virus (H3N8), In: H. Nakajima and W. Plowright (Ed.) Equine Infectious Diseases VII: Proceedings of Seventh International Conference on Equine Infectious Diseases.

R & W Publications Ltd, Newmarket, UK., pp. 169-174.

79. Hannant, D., Mumford, J. A., 1996

Equine influenza, In: Studdert, M.J., Horzinek, M.C. (Eds.). Virus Infections of Vertebrates, Virus infections of equines.

Elsevier Science Publishers, Amsterdam., pp. 285-293.

80. Heldens, J.G.M., Pouwels, H.G.W., Derks, C.G.G., Van de Zande, S.M.A., Hoeijmakers, M.J.H., 2009.

The first safe inactivated equine influenza vaccine formulation adjuvanted with ISCOM-Matrix that closes the immunity gap.

Vaccine., **27**(40),5530-7.

81. Horimoto, T., Kawaoka, Y., 2001

Pandemic threat posed by avian influenza A viruses.

Clin. Microbiol. Rev., **14**, 129-149.

82. Ihara, T., Kano, R., Nakajima, Y., Sugiura, T., Imagawa, H., Izuchi, T., Samejima, T., 1997

Detection of antibody to Japanese encephalitis virus (JEV) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

J. Equine Sci., **8**, 25–28.

83.

84. Ilobi C.P., Henfrey R., Robertson J.S., Mumford J.A., Erasmus B.J. and Wood J.M., 1994.

Antigenic and molecular characterisation of host-cell mediated variants of equine H3N8 influenza viruses.

J. Gen. Virol., **75**, 669–673.

85. Ilobi, C.P., Nicolson, C., Taylor, J., Mumford, J.A., Wood, J.M. and Robertson, J.S., 1998.

Direct sequencing of the HA gene of clinical equine H3N8 influenza virus and comparison with laboratory derived viruses.

Arch. Virol., **143**, 891-901.

86. Ismail, T. M., Sami, A. M., Youssef, H. M., Abouzaid, A. A., 1990.

An outbreak of equine influenza type 1 in Egypt in 1989

Vet. Med. J. Giza., **38**, 195-206.

87. Ito, M., Nagai, M., Hayakawa, Y., Komae, H., Murakami, N., Yotsuya, S., Asakura, S., Sakoda, Y., Kida, H., 2008

Genetic Analyses of an H3N8 Influenza Virus Isolate, Causative Strain of the Outbreak of Equine Influenza at the Kanazawa Racecourse in Japan in 2007.

J. Vet. Med. Sci., **70**, 899-906.

88. Jaeschke G., Lange W., 1993.

Beobachtungen bei equinen Influenza-Epidemien mit viraler Antigendrift in Berlin 1988 - 1991

Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr., **106**, 119-123.

89. Kahn C.M., Line S., 2003.

The Merck veterinary manual

<http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/121303.htm>.

90. Kaddissi, B., Daoudi, N., El Kantour, A., Id Sidi Yahia, K., Benazzou, H., 1998.

Premier isolement au Maroc du virus de la grippe équine baptisé A/Equi/Maroc/1/97. *L'Espace Vétérinaire.*, **14**, pp. 10.

91. Karlsson Hedestam, G.B., Fouchier, R.A.M., Phogat, S., Burton, D.R., Sodroski, J., Wyatt, R.T., 2008.

The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus
Nat. Rev. Microb., **6**, 143-155.

92. Kittelberger, R., McFadden, A.M.J., Hannah M.J., Jenner, J., Bueno, R., Wait, J., Kirkland, P.D., Delbridge, G., Heine, H.G., Selleck, P.W., Pearce, T.W., Pigott, C.J., O'Keefe, J.S., 2011.

Comparative evaluation of four competitive/blocking ELISAs for the detection of influenza A antibodies in horses.
Vet. Microbiol., **148**, 377–383.

93. Kirkland, P.D., Finlaison, D.S., Crispe, E., Hurt, A.C., 2010.

Influenza Virus Transmission from Horses to Dogs, Australia
Emerg. Infect. Dis., **4**, 699-702.

94. Krug, R.M., 1981.

Priming of influenza viral RNA transcription by capped heterologous RNAs
Curr. Top. Microbiol. Immunol., **93**, 125–49.

95. Lai, A.C.K., Chambers, T.M., Holland Jr, R.E., Morley, P.S., Haines, D.M., Townsend, H.G., Barrandeguy, M., 2001.

Diverged evolution of recent equine-2 influenza (H3N8) viruses in the Western Hemisphere.
Arch. Virol., **149**, 1063-1074.

96. Lai, A.C.K., Rogers, K.M., Glaser, A., Tudor, L., Chambers, T., 2004

Alternate circulation of recent equine-2 influenza viruses (H3N8) from two distinct lineages in the United States

Virus Res., **100**, 159–164

97. Landolt, G.A., 2006.

Review of Interspecies Transmission of Influenza A Viruses: Implications for the Equine Population.

Proc. Am. Assoc. Equine. Pract., **52**, 228-231.

98. Legrand, L., Pitel, P.H., Fortier, G., Pronost, S., 2008a.

La grippe équine : du diagnostic a l'épidémie moléculaire.

34^{ème} journée d'étude, Les Haras Nationaux, France., pp. 217-225.

99. Legrand, L., Pitel, P.H., Fortier, G., Freymuth, F., Pronost, S., 2008b.

Equine influenza virus: Comparison of three methods, Rapid tests, PCR and Real Time PCR in a prospective study from November 2005 to June 2006 - Phylogenic analysis of isolated strains.

Proc. WEVA. 10th Int. Cong. Moscow. Russia., pp. 400.

100. Legrand, L., Pronost, S., Pitel, P.H., Fortier, C., Fortier, G., 2008c.

Grippe équine : le virus, son évolution et les souches virales actuelles.

équi'dée., **64**, 50-53.

101. Leminor, L., Veron, M., 1982.

Bactériologie médicale.

Médecine-Sciences. Flammarion, Paris, France., pp. 114-115.

102. Liu, I.K., Pascoe, D.R., Chang, L.W. and Zee, Y.C. (1985)

Duration of maternally derived antibodies against equine influenza in new born foals

Am. J. Vet. Res., **46**, 2078–80.

103. Livesay, G.J., O'Neill, T., Hannant, D., Yadav, M.P., Mumford, J.A., 1993.

The outbreak of equine influenza (H3N8) in the United Kingdom in 1989; diagnostic use of an antigen capture ELISA.

Vet. Rec., **133**, 515–519.

104. Lu, Z., Chambers, T.M., Boliar, S., Branscum, A.J., Sturgill, T.L., Timoney, P.J., Reedy, S.E., Tudor, L.R., Dubovi, E.J., Vickers, M.L., Sells, S. and Balasuriya, U.B.R. (2009)

Development and Evaluation of One-Step TaqMan® Real-Time Reverse Transcription-PCR Assays Targeting NP, M and HA Genes of Equine Influenza Virus

J. Clin. Microbiol., **47**(12), 3907-13.

105. Lunn, D. P., Soboll, G., Schram, B. R., Quass, J., McGregor, M. W., Drape, R. J., Macklin, M. D., McCabe, D. E., Swain, W. F., Olsen, C. W., 1999.

Antibody responses to DNA vaccination of horses using the influenza virus hemagglutinin gene.

Vaccine., **17** (18), 2245-2258.

106. Lunn, D. P., Hussey, S., Sebing, R., Rushlow, K. E., Radecki, S. V., Whitaker-Dowling, P., Youngner, J. S., Chambers, T. M., Holland Jr, R. E., Horohov, D. W., 2001.

Safety, efficacy, and immunogenicity of a modified-live equine influenza virus vaccine in ponies after induction of exercise-induced immunodepression.

J. Am. Vet. Med. Assoc., **218**, 900-906.

107. Madic, J., Martinovic, S., Naglić, T., Hajsig, D., Cvetnić, S., 1996.

Serological evidence for the presence of A/equine- I influenza virus in unvaccinated horses in Croatia.

Vet. Rec., **138**, 68.

108. Manuguerra, J. C., 1999.

Les nouveaux virus de la grippe.

Bull. Acad. Natl. Méd., **183** (7), 1377-1390.

109. Manuguerra, J.C., Zientara, S., Sailleau, C., Rousseaux, C., Gicquel, B., Rijks, I., Werf S.V.D., 2000.

Evidence for evolutionary stasis and genetic drift by genetic analysis of two equine influenza H3 viruses isolated in France

Vet. Microbiol., **74**, 59-70.

110. Marriott, I., Huet-Hudson, Y.M., 2006

Sexual dimorphism in innate immune responses to infectious organisms

Immunol Res., **34**, 177–93.

111. Martella, V., Elia, G., Decaro, N., Di Trani, L., Lorusso, E., Campolo, M., Desario, C., Parisi, A., Cavaliere, N., Buonavoglia, C., 2007.

An outbreak of equine influenza virus in vaccinated horses in Italy is due to an H3N8 strain closely related to recent North American representatives of the Florida sub-lineage.

Vet. Microbiol., **121**, 56–63

112. Martin, K., Helenius A., 1991.

Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus

J. Virol., **65** (1), 232–44.

113. Mazanec, M.B., Coudret, C.L., Fletcher, D.R., 1995

Intracellular neutralization of influenza virus by immunoglobulin A anti-hemagglutinin monoclonal antibodies.

J. Virol., **69**, 1339-1343.

114. McGuire, T.C., Crawford, T.B., 1973

Passive immunity in the foal: measurement of immunoglobulin classes and specific antibody. *Am. J. Vet. Res.*, **34**, 1299-1303.

115. Minke, J.M., Bublot, M., 2004.

La grippe équine : une mise à jour

Bull. Acad. Vét. France., Tome 157, **4**, 43-49

116. Minke, J.M., Siger, L., Karaca, K., Austgen, L., Gordy, P., Bowen, R., Renshaw, R.W., Loosmore, S., Audonnet, J.C., Nordgren, B., 2004.

Recombinant canarypoxvirus vaccine carrying the prM/E genes of West Nile virus protects horses against a West Nile virus-mosquito challenge.

Arch. Virol. Suppl., 221-230.

117. Minke, J.M., Fischer, L., Baudu, P., Guigal, P.M., Sindle, T., Mumford, J.A., Audonnet, J.C., 2006.

Use of DNA and recombinant canarypox (ALVAC) vectors for equine herpes vaccination.

Vet. Immunol. Immunopathol., **111**(1-2), 47-57.

118. Minke, J.M., Toulemonde, C.E., Coupier, H., Guigal, P.M., Dinic, S., Sindle, T., Jessett, D., Black, L., Bublot, M., Pardo, M.C., Audonnet, J.C., 2007.

Efficacy of a canarypox-vectored recombinant vaccine expressing the hemagglutinin gene of equine influenza H3N8 virus in the protection of ponies from viral challenge.

Am. J. Vet. Res., **68**, 213–219.

119. Morley, P.S., Bogdan, J.R., Townsend, H.G.G., Haines, D.M., 1995.

The effect of changing single radial haemolysis assay method when quantifying influenza A antibodies in serum.

Vet. Microbiol., **44**, 101-110.

120. Morley, P.S., Townsend, H.G., Bogdan, J.R., Haines, D.M., 2000.

Risk factors for disease associated with influenza virus infections during three epidemics in horses.

J. Am. Vet. Med. Ass. **216**, 545-550.

121. Muller I., Pinto E., Santibanez M.C., Celedon M.O., Valenzuela P.D.T., 2009.

Isolation and characterization of the equine influenza virus causing the 2006 outbreak in Chile

Vet. Microbiol., **137**, 172-177.

122. Mumford, J.A., Wood, J.M., Folkers, C., Schild, G.C., 1988.

Protection against experimental infection with influenza virus A/equine /Miami/63(H3N8) provided by inactivated whole virus vaccines containing homologous virus.

Epidem. Inf., **100**, 501-510.

123. Mumford J.A., 1990.

The diagnosis and control of equine influenza

Proc. Am. Assoc. Equine. Pract., **36**, 377-385.

124. Mumford J.A., Hannant D., Jessett D.M., 1990.

Experimental infection of ponies with equine influenza (H3N8) viruses by intranasal inoculation or exposure to aerosols

Equine Vet. J., **22**, 93-98.

125. Mumford J.A., 1992.

Respiratory viral disease, in Robinson NE (ed): Current Therapy in Equine Medicine (3 ed).

WB Saunders. Philadelphia., pp. 316-324.

126. Mumford, J.A., Wood, J., 1992.

Establishing an acceptability threshold for equine influenza vaccines.

Dev. Biol. Stand., **79**, 137-146.

127. Mumford, J.A., Wood, J., 1993.

Conference report on WHO/OIE meeting: consultation a newly strains of equine influenza. *Vaccine.*, **11**, 1172 – 1175.

128. Mumford, J.A., Jessett, D.M., Dunleavy, U., Wood, J.L.N., Hannant, D., Sundquist, B., Cook, R.F., 1994a.

Antigenicity and immunogenicity of experimental equine influenza ISCOM vaccines.

Vaccine., **12**, 857-863.

129. Mumford, J.A., Jessett, D.M., Rollinson, E.A., Hannant, D., Draper, M.E., 1994b

Duration of protective efficacy of equine influenza immunostimulating complex/tetanus vaccines.

Vet. Rec., **134**, 158-162.

130. Mumford, J. A., Wilson, H., Hannant, D., Jessett, D. M., 1994c.

Antigenicity and immunogenicity of equine influenza vaccines containing a Carbomer adjuvant.

Epidemiol. Infect., **112** (2), 421-437.

131. Mumford, J.A., 1999.

The equine influenza surveillance program

Adv. Vet. Med., **41**, 379-387.

- 132. Nelson, K.M., Schram, B.R., McGregor, M.W., Sheoran, A.S., Olsen, C.W., Lunn, D.P., 1998.**

Local and systemic isotype-specific antibody responses to equine influenza virus infection versus conventional vaccination.

Vaccine., **16**, 1306-1313.

- 133. Newton J., Mumford J., 1995**

Equine influenza in vaccinated horses

Vet. Rec., **137**, 495-496.

- 134. Newton, J. R., Verheyen, K., Wood, J. L. N., Yates, P. J., Mumford, J. A., 1999**

Equine influenza in the United Kingdom in 1998

Vet. Rec., **145**, 449-452

- 135. Newton, J.R., Townsend, H.G.G., Wood, J.L.N., Sinclair, R., Hannant, D., Mumford, J.A., 2000.**

Immunity to equine influenza: relationship of vaccine-induced antibody in young Thoroughbred racehorses to protection against field infection with influenza A/equine-2 viruses (H3N8).

Equine Vet. J., **32**, 65-74

- 136. Newton, J.R., Daly, J.M., Spencer, L., Mumford, J.A., 2006.**

Description of the outbreak of equine influenza (H3N8) in the United Kingdom in 2003, during which recently vaccinated horses in Newmarket developed respiratory disease

Vet. Rec., **158**, 185-192

- 137. Newton, R., Cooke, A., Elton, D., Bryant, N., Rash, A., Bowman, S., Blunden,**

T., Miller, J., Hammond, T.A., Camm, I., Day, M., 2007.

Canine influenza: cross-species transmission from horses.

Vet. Rec., **161**, 142–3.

138. Nyaga, P.N., Wiggins, A.D., Priester, W.A., 1980.

Epidemiology of equine influenza, risk by age, breed and sex

Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis., **3**, 67-73.

139. OIE., 2004a.

Highly pathogenic avian influenza

http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_summry.htm.

140. OIE., 2004b.

Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 2.5.5,

Equine influenza.

http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00083.htm.

141.OIE., 2005.

Manuel terrestre de l'OIE. Grippe équine : Chapitre 2.5.5.

www.oie.int, pp. 759 – 771.

142. OIE., 2006.

Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals

143.OIE., 2008a.

Manual of Standards for Diagnostics Tests and Vaccines, Equine Influenza,

Chapter 2.5.7.

OIE. Paris., pp. 875-877.

144. OIE., 2008b.

Conclusions and recommendations from the Expert Surveillance Panel on Equine Influenza Vaccines.

Bull. OIE., pp. 42–45.

145. OIE., 2011.

Groupe d'experts de l'OIE chargé de la surveillance de la composition des vaccins contre la grippe équine.

Bull. OIE., pp. 50–51.

146. Olsen, C.W., McGregor, M.W., Dybdahl-Sissoko, N., Schram, B.R., Nelson, K.M., Lunn, D.P., Macklin, M.D., Swain, W.F., Hinshaw, V.S., 1997.

Immunogenicity and efficacy of baculovirus-expressed and DNA-based equine influenza virus hemagglutinin vaccines in mice.

Vaccine., **15**, 1149-1156.

147. Olsen, C.W., Brammer, L., Easterday, B.C., Arden, N., Belay, E., Baker, I., Cox, N.J., 2002.

Serologic evidence of H1 swine influenza virus infection in swine farm residents and employees

Emerg. Infect. Dis., **8**, 814-9.

148. Oxburgh, L., Berg, M., Klingeborn, B., Emmoth, E., Linne, T., 1994.

Evolution of H3N8 equine influenza virus from 1963 to 1991

Virus Res., **34**, 153–165.

149. Oxburgh, L., Klingeborn, B., 1999.

Cocirculation of two distinct lineages of equine influenza virus subtype H3N8.

J. Clin. Microbiol., **37**, 3005–3009.

150. Oxburgh, L., Hagstrom, A. 1999.

A PCR based method for the identification of equine influenza virus from clinical samples.

Vet. Microbiol., **67**, 161-174.

151. Ozaki, H, Sugiura, T, Sugita, S, Imagawa, H., Kida, H., 2001.

Detection of antibodies to the nonstructural protein (NS1) of influenza A virus allows distinction between vaccinated and infected horses.

Vet. Microbiol., **82**, 111-119.

152. Paillot, R., Hannant, D., Kydd, J.H., Daly, J.M., 2006.

Vaccination against equine influenza: Quid novi?

Vaccine., **24**, 4047–4061

153. Paillot, R., 2007.

Développement et application de méthodes de mesure et caractérisation de l'immunité à médiation cellulaire induite par les virus respiratoires équins.

Thèse. Doctorat. École Pratique des Hautes Études, Sciences de la Vie et de la Terre, Paris, France., 63 pages.

154. Palese, P., Tobita, K., Ueda, M., Compans, R.W., 1974

Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase

Virology., **61** (2), 397–410.

155. Palese, P., Compans, R.W., 1976

Inhibition of influenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA): mechanism of action.

J. Gen. Virol., **33** (1), 159–63.

156. Palese, P., Shaw, M.L., 2007

Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM,

(Ed.). Field's virology. 5th ed., volume 2.

Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia., pp. 1647-1690.

157. Pinto, L.H., Holsinger, L.J., Lamb, R.A., 1992

Influenza virus M2 protein has ion channel activity.

Cell., **69** (3), 517–28.

158. Plateau, E., Cruciere, C., 1983.

Study on radial haemolysis method for the detection of anti-influenza equiantibodies in equine sera: reliability and expression of the results.

Zentralbl. Veterinarmed [B]., **30**, 512-520.

159. Plateau, E., Cruciere, C., Jacquet, A., Cheyroux, M., 1984.

Mise au point et recherche en cours sur l'évolution épidémiologique et antigénique de la grippe équine en France.

Bull. Mens. Soc. Vét. Prat. Fr., **68**, 6-10.

160. Powell, D. G., Timoney, P. J., Murphy, T., Allen, G., Donahue, J. M., Wilson, J., Tudor, L., Ferris, K., Kawaoka, Y., 1988.

The application of advanced molecular techniques to investigate epizootics of infectious disease in the equine population

Acta. Vet. Scand. Suppl., **84**, 337-9.

161. Powell, D. G., 1991.

Viral respiratory disease of the horse

Vet. Clin. North. Am. Equine Pract., **7**, 27-52.

162. Powell, D.G., Watkins, K.L., Li, P.H., Shortridge, K.F., 1995.

Outbreak of equine influenza among horses in Hong Kong during 1992

Vet. Rec., **136**, 531-536.

163. Pronost, S., Legrand, L., Pitel, P.H., Maziere, G., Fortier, G., 2008.

Grippe équine : Quelles méthodes de diagnostic à l'heure actuelle ?

équi'dée., **64**, 53-56.

164. Pronost, S. 2010.

Apports des outils de génétique moléculaire à la connaissance de deux infections virales de cheval : Herpèsvirus équin 1 et Artérite virale équine.

Thèse. Doctorat. Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie. Université de Caen. Caen, France., 131 pages.

165. Qi, T., Guo, W., Huang, W., Dai, L., Zhao, L., Li, H., Li, X., Zhang, X., Wang, Y., Yan, Y., He, N., Xiang, W., 2010.

Isolation and genetic characterization of H3N8 equine influenza virus from donkeys in China

Vet. Microbiol., **144**, 455-460.

166. Quinlivan, M., Cullinane, A., Nelly, M., Van Maanen, K., Heldens, J., Arkins, S., 2004.

Comparison of sensitivities of virus isolation, antigen detection, and nucleic acid amplification for detection of equine influenza virus.

J. clin. Microbiol., **42**, 759-763.

167. Quinlivan, M., Dempsey, E., Ryan, F., Arkins, S. and Cullinane, A., 2005.

Real-time reverse transcription PCR for detection and quantitative analysis of equine influenza virus.

J. clin. Microbiol., **43**, 5055-5057.

168. Ramsay, A.J., Husband, A.J., Ramshaw, I.A., Bao, S., Matthaei, K.I., Koehler, G., Kopf, M., 1994.

The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses in vivo

Science., **264**, 561-563.

169. Reeve-Johnson, L., 2007

Equine influenza in Australia

Vet. Rec., **161**, 635.

170. Reid, A.H., Taubenberger, J.K., 2003.

The origin of the 1918 pandemic influenza virus: a continuing enigma.

J. Gen. Virol., **84**, 2285-92.

171. Rooney, J.R., Ames, I.A., 1996.

Equine pathology

University Press, Iowa State., pp. 8-36.

172. Rozek, W., Purzycka, M., Polak, M.P., Gradzki, Z., Zmudzinski, J.F., 2009.

Genetic typing of equine influenza virus isolated in Poland in 2005 and 2006.

Virus Res., **145**, 121–126.

173. Saito, T., Kawaoka, Y., Webster, R.G., 1993.

Phylogenetic analysis of the N8 neuraminidase gene of influenza A viruses.

Virology., **193**, 868-876.

174. Schickli, J.H., Flandorfer, A., Nakaya, T., Martinez-Sobrido, L., Garcia -Sastre, A., Palese, P., 2001.

Plasmid-only rescue of influenza A virus vaccine candidates

Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., **356**, 1965-1973

175. Schild, G.C., Pereira, M.S., Chakraverty, P., 1975.

Single radial haemolysis: a new method for the assay of antibody to influenza haemagglutinin.

Bull. WHO., **52**, 43-50.

176. Scholtissek, C., Faulkner, G. P., 1979.

Amantadine-resistant and –sensitive influenza A strains and recombinants

J. Gen. Virol., **44** (3), 807-815.

177. Sebbag, H., 1998.

Les Orthomyxoviridae.

Revue. Méd. Vét., **149** (12), 1087-1102.

**178. Sidibé, S., Bocoum, Z., Simbé, C.F., Tounkara, K., Bakkali, M.M., Kané, M.,
2002**

Grippe équine au Mali : résultats d'une enquête séroépidémiologique

Revue. Élev. Méd. Vét. Pays Trop., **55** (2), 89-92.

179. Siczkarski S.B., Whittaker G.R., 2005.

Viral entry

Curr. Top. Microbiol. Immunol., **285**, 1-23.

180. Singh, G., 1994.

Characterization of A/eq-1 virus isolated during the equine influenza epidemic in
India.

Acta. Virol., **38**, 25-6

181. Slater, J., Hannant, D., 2000.

Equine immunity to viruses

Vet. Clin. North Am. Equine Pract., **16**, 49-68.

**182. Soboll, G., Horohov, D.W., Aldridge, B.M., Olsen, C.W., McGregor, M.W.,
Drape, R.J., Macklin, M.D., Swain, W.F., Lunn, D.P., 2003a.**

Regional antibody and cellular immune responses to equine influenza virus
infection, and particle mediated DNA vaccination.

Vet. Immunol. Immunopathol., **94**, 47-62.

**183. Soboll, G., Nelson, K.M., Leuthner, E.S., Clark, R.J., Drape, R., Macklin,
M.D., Swain, W.F., Olsen, C.W., Lunn, D.P., 2003b.**

Mucosal co-administration of cholera toxin and influenza virus hemagglutinin-DNA in ponies generates a local IgA response.

Vaccine., **21**, 3081–3092.

184.Soboll, G., Hussey, S.B., Minke, J.M., Landolt, G.A., Hunter, J.S., Jagannatha, S., Lunn, D.P., 2010.

Onset and duration of immunity to equine influenza virus resulting from canarypox-vectored (ALVAC1) vaccination

Vet. Immunol. Immunopathol., **135**(1-2), 100-7.

185.Sovinova, O., Tumova, B., Pouska, F., 1958.

Isolation of a virus causing respiratory disease in horses

Acta. Virol., **2**, 52-61.

186. Stegmann, T., 2000.

Membrane fusion mechanisms: the influenza hemagglutinin paradigm and its implications for intracellular fusion.

Traffic., **1**(8), 598–604.

187. Steinhauer, D.A., 1999.

Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus

Virology., **258**(1), 1–20.

188. Studdert, M.J., 1996.

Orthomyxoviridae, in Studdert MJ (ed): Virus Infections of Equines.

Elsevier Science Publishers, Amsterdam., pp. 281-284.

189. Sugiura, T., Kondo, T., Matsumura, T., Imagawa, H., Kamada, M., Ihara, T., 1995.

Field application of enzymelinked immunosorbent assay for screening of equine infectious anemia

J. Equine Sci., **6**, 15–20.

- 190. Sugiura, T., Kondo, T., Matsumura, T., Imagawa, H., Kamada, M., Ihara, T., 1997.**

Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for titration of antibody to equine herpesvirus type 1

J. Equine Sci., **8**, 57–61.

- 191. Sugiura, T., Sugita, S., Imagawa, H., Kanaya, T., Ishiyama, S., Saeki, N., Uchiyama, A., Tanigawa, M., Kuwano, A., 2001.**

Serological diagnosis of equine influenza using the hemagglutinin protein produced in a baculovirus expression system.

J. Virol. Meth., **98**, 1–8.

- 192. Tamura, S., Funato, H., Hirabayashi, Y., Suzuki, Y., Nagamine, T., Aizawa, C., Kurata, T., 1991.**

Cross-protection against influenza A virus infection by passively transferred respiratory tract IgA antibodies to different hemagglutinin molecules.

Eur. J. Immunol., **21**, 1337-1344.

- 193. Tamura, S., Kurata, T., 2004**

Defense mechanisms against influenza virus infection in the respiratory tract mucosa

Jpn. J. Infect. Dis., **57**, 236-247.

- 194. Thomas, P.W., Nikolaos, I.S., 2008.**

Inactivation of influenza A viruses in the environment and modes of transmission: A critical review.

J. Infection., **57**, 361 – 373

- 195. Timoney, P. J., 1996.**

Equine influenza

Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis., **19** (3), 205-211.

196. Tissier, O., 2008.

Étude comparative de séquences du virus de la grippe équine en France.

Thèse. Docteur. Vét. ENV Lyon, France., 164 pages.

197. Tizard, I., 1977.

An introduction to veterinary immunology

W.B. Saunders. Philadelphia, PA, USA., pp. 141-142.

198. Toulemonde, C.E., Daly, J., Sindler, T., Guigal, P.M., Audonnet, J.C., Minke, J.M., 2005.

Efficacy of a recombinant equine influenza vaccine against challenge with an American lineage H3N8 influenza virus responsible for the 2003 outbreak in the United Kingdom.

Vet. Rec., **156**, 367–371.

199. Townsend, H.G., Penner, S.J., Watts, T.C., Cook, A., Bogdan, J., Haines, D.M., Griffin, S., Chambers, T., Holland, R. E., Whitaker-Dowling, P., Youngner, J. S., Sebring, R. W., 2001.

Efficacy of a cold adapted, intranasal equine influenza vaccine: challenge trials.

Equine Vet. J., **33**, 637–43.

200. United States Department of Health and Human Services., 1982.

Concepts and Procedures for Laboratory-Based Influenza Surveillance.

Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia, USA., pp. 81-835.

201. Uppal, P.K., Yadav, M.P., 1987.

Outbreak of equine influenza in India.

Vet. Rec., **121**, 569–570.

202. Van Maanen, C., Cullinane, A., 2002.

Equine influenza virus infections: an update.

Vet. Q., **24**, 79-94.

203. Vandaële, E., 2004.

Premiers vaccins vivants recombinants contre la grippe équine.

Point Vet., **242**, 14-15.

204. Verthelyi, D., 2001.

Sex hormones as immunomodulators in health and disease

Int. Immunopharmacol., **1**, 983-993.

205. Vester, D., Genzel, Y., 2005.

Biomolecular analysis of dynamic interactions between influenza viruses and host cells.

Max-Planck-Institut, MPI Magdeburg, fig.1, p.1.

206. Virmani, N., Bera, B.C., Singh, B.K., Shanmugasundaram, K., Gulati, B.R.,

Barua, S., Vaid, R.K., Gupta, A.K., Singh, R.K., 2010.

Equine influenza outbreak in India (2008-09): Virus isolation, sero-epidemiology and phylogenetic analysis of HA gene.

Vet. Microbiol., **143**, 224-237.

207. Wadell, G.H., Teigland, M.B., Sigel, M.M., 1963.

A new influenza virus associated with equine respiratory disease

J. Am. Vet. Med. Assoc., **143**, 587-590.

208. Waldeman, O., Kobe, K., Pape, J., 1934.

The etiology of outbreaks of coughing in a racing centre (Hoppengarten) in Germany: preliminary communication.

Vet. Rec., **14**, 277-280.

- 209. Watrang, E., Jessett, D.M., Yates, P., Fuxler, L., Hannant, D., 2003.**
Experimental infection of ponies with equine influenza A2 (H3N8) virus strains of different pathogenicity elicits varying interferon and interleukin-6 responses.
Viral. Immunol., **16**, 57-67.
- 210. Webster, R. G., Bean, W. J., Gorman, O. T., Chambers, T. M., Kawaoka, Y., 1992.**
Evolution and ecology of influenza A viruses
Microbiol. Rev., **56**, 152-17.
- 211. Webster, R.G., 1993.**
Are equine 1-influenza viruses still present in horses?
Equine Vet. J., **25**, (6), 537-538
- 212. Webster, R.G., Fynan, E.F., Santoro, J.C., Robinson, H., 1994.**
Protection of ferrets against influenza challenge with a DNA vaccine to the haemagglutinin.
Vaccine., **12**, 1495-1498.
- 213. Wei, G., Xue-Feng, L., Yan, Y., Ying-Yuan, W., Ling-Li, D., Li-Ping, Z., Wen-Hua, X., Jian-Hua, Z., 2010.**
Equine influenza viruses isolated during outbreaks in China in 2007 and 2008.
Vet. Rec., **167**, 382-383.
- 214. Wernery, R., Yates, P.J., Wernery, U., Mumford, J.A., 1998.**
An equine influenza outbreak in a polo club in Dubai, United Arab Emirates in 1995/96. In: Wernery U., Wade J.F., Mumford J.A., Kaaden O.R. (Eds.),
Proc. 8th Int. Conference on Equine Infections Diseases, Dubai., pp. 342–346.
- 215. Wharton, S.A., Belshe, R.B., Skehel, J.J., Hay, A.J., 1994**

Role of virion M2 protein in influenza virus uncoating: specific reduction in the rate of membrane fusion between virus and liposomes by amantadine.

J. Gen. Virol., **75**(4), 945–8.

216. White, J.M., 1992.

Membrane fusion.

Science., **258** (5084), 917-924.

217. WHO, 1972.

Notes épidémiologiques sur des maladies transmissibles d'importance internationale et informations concernant l'application du Règlement sanitaire international (1969)

Relevé épidém. hebd., **47**, 1–16.

218. Wiley, D.C., Skehel, J.J., 1987.

The structure and function of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus

Annu. Rev. Biochem., **56**, 365-394

219. Willoughby, R., Ecker, G., McKee, S., Riddolls, L., Vernailen, C., Dubovi, E., Lein, D., Mahony, J.B., Chernesky, M., Nagy, E., 1992.

The effects of equine rhinovirus, influenza virus and herpesvirus infection on tracheal clearance rate in horses.

Can. J. Vet. Res., **56**, 115-121.

220. Wilson, I.A., Skehel, J.J., Wiley, D.C., 1981.

Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution

Nature., **289** (5796), 368-373

221. Wilson, W.D., 1993.

Equine influenza

Vet. Clin. North. Am., **9** (2), 257-278.

222. Wood, J.M., Gaines-Das, R.E., Taylor, J., Chakraverty, P., 1994.

Comparison of influenza serological techniques inter-national collaborative study.

Vaccine., **12**, 167-174.

223. Wozniak, M., 2004

Undiagnosed illness, canine – USA (Florida). Illness spreads at greyhound tracks:

3 dogs at Fort Myers show signs of Disease.

Pro. Med-Ahead. Digest., pp. 159.

224. Wright, P., Webster, R., 2001.

Orthomyxoviruses. In: Knipe HP (Ed.). *Field's Virology*.

Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia., pp. 1533–1579.

225. Yamanaka, T., Tsujimura, K., Kondo, T., Matsumura, T., 2006.

In vitro efficacies of oseltamivir carboxylate and zanamivir against equine influenza A viruses.

J. Vet. Med. Sci., **68** (4), 405-408.

226. Yamanaka, T., Niwa, H., Tsujimura, K., Kondo, T., Matsumura, T., 2008.

Epidemic of equine influenza among vaccinated racehorses in Japan in 2007.

J. Vet. Med. Sci., **70**, 623–625.

227. Zientara, S., Plateau, E., 1992.

Les vaccinations chez le cheval à l'entraînement et au haras.

Bull. Mens. Soc. Vét. Prat. Fr., **76** (2), 85 – 100.

228. Zientara, S., Plateau, E., 1993.

Vaccins et vaccinations chez le cheval.

Point Vét., **24** (149), 601-610.

229.Zientara, S., 2001.

Epidémiologie moléculaire : l'exemple de la grippe des équidés

Epidémiol. Santé. Anim., **39**, 69–74.

230.Zientara, S., 2003.

Comment prévenir et soigner les grippes des équidés

Bull. GTV., **22**, 259 – 264.

231.Zientara, S., Dauphin, G., 2005.

La grippe : description et évolution

Bull. RESP., **14**, 1-6

Publications & Communications

Publication internationale

Enquête séro-épidémiologique sur la grippe équine en Algérie

F. LAABASSI^{1*}, B. MAMACHE¹, D. GAUDAIRE², G. AMELOT², A.M. NASRI³, S. PRONOST⁴, L. LEGRAND⁴, A. HANS²

¹Laboratoire Environnement, Santé et Production Animale (LESPA), Département Vétérinaire, Institut des Sciences Vétérinaires et des Sciences Agronomiques, Université de Batna, 05000, ALGERIE.

²Ansès – Dozulé, Laboratoire de Pathologie équine, Unité virologie, 14430 Goustranville, FRANCE.

³Clinique Vétérinaire, Haras National Chaou Chaua, Tiaret 14000, ALGERIE.

⁴Laboratoire Départemental Frank Duncombe, 1 Route de Rosel, 14053 CAEN Cedex 4, FRANCE.

*Auteur chargé de la correspondance : flaabassi@yahoo.fr

Revue Méd. Vét., 2012, 163, 5, 227-234

Communications internationales

- **F. LAABASSI, A. HANS, L. LEGRAND, D. GAUDAIRE, G. FORTIER, S. PRONOST**
Enquête Séro-épidémiologique sur la Grippe Équine en Algérie.
Journées Annuelles de l'Association Vétérinaire Équine Française (AVEF),
2 – 4 Décembre 2011, Lyon, France.
www.ivis.org, Proceedings de l'AVEF 2011, pp 559 – 560
- **F. LAABASSI, L. LEGRAND, D. GAUDAIRE, G. AMELOT, A.M. NASRI, S. PRONOST, B. MAMACHE, A. HANS**
Épizootie de Grippe Équine En Algérie (2011) : Caractérisation, Séro-épidémiologie, Analyse phylogénétique du gène HA.
29^{ème} Congrès Vétérinaire Maghrébin, Alger, 07-08 avril 2012.
- **F. LAABASSI, L. LEGRAND, D. GAUDAIRE, G. AMELOT, S. PRONOST, B. MAMACHE, A. HANS.**
Épizootie de Grippe Équine en Algérie (2011) : qRT-PCR, essai d'isolement et analyse phylogénétique du gène HA
Journées Annuelles de l'Association Vétérinaire Équine Française (AVEF),
11 – 13 Octobre 2012, Reims, France.
www.ivis.org, Proceedings de l'AVEF 2012, pp 304 – 305.
- **A. Hans, F. Laabassi, G. Amelot, L. Legrand, D. Gaudaire, C. Laugier, S. Pronost, and S. Zientara**
Serological evidence of circulation of Equine H3N8 Influenza Virus in Algeria and its molecular characterization
9th International Conference on Equine Infectious Diseases (ICEID), University of Kentucky Lexington, KY, USA
Journal of Equine Veterinary Science., October 2012, **32**(10S): S11-S12
- **G. AMELOT, F. LAABASSI, L. LEGRAND, D. GAUDAIRE, C. LAUGIER, S. PRONOST, S. ZIENTARA, A. HANS**
Mise en évidence de la circulation de virus de la grippe équine en Algérie.
XIV^{es} Journées Francophones de Virologie, 29 et 30 Mars 2012. Institut Pasteur de Paris, France.
Virologie, 2012, **16** (Supplément) : pp47.

Résumé

Le virus influenza équin (EIV), appartient à la famille des *Orthomyxoviridae*, genre *Influenzavirus*, type A. L'EIV se caractérise par une dissémination très rapide et provoque une maladie à fort enjeux économique pour la filière équine. Deux sous-types distincts H7N7 et H3N8 sont décrits comme agents infectieux des équidés, mais seul ce dernier continue de circuler et d'évoluer. En Algérie, la recherche et l'identification des différentes pathologies équines ne sont pas prises en charge. Il n'existe aucun programme national permettant de lutter contre la propagation du virus influenza équin et l'unique action des services vétérinaires se limite à la mise en œuvre d'un traitement symptomatique et à la gestion d'éventuelles infections bactériennes secondaires. L'objectif de cette étude est d'étudier la séroprévalence de la grippe équine en Algérie afin d'obtenir une information objective sur la situation de la maladie dans ce pays, ainsi que la répartition de chevaux séropositifs dans les différentes régions du pays en fonction de l'âge, du sexe et de la race des animaux. De plus, ce travail présente la mise en évidence et la caractérisation moléculaire du virus responsable de l'épizootie de grippe équine qui avait sévi en 2011 à Tiaret.

Mots clés : Virus de la Grippe Équine (EIV), Sous-type 1 (H7N7) et 2 (H3N8), Clade 2, Séro-épidémiologie, Inhibition de l'héماغglutination (IHA), qRT-PCR, phylogénie, Cheval, Algérie.

Abstract

Equine influenza virus (EIV), belongs to the family of the *Orthomyxoviridae*, genus *Influenzavirus*, type A, is one of the main pathogenic agents responsible of equine respiratory diseases. Two distinct subtypes H7N7 and H3N8 are known to be infectious agents of the equines, but only the latter continues to circulate and to evolve. In Algeria, the research and the identification of the different equine diseases are not taken in charge. The vaccination against EI is not mandatory and the unique action of the veterinary services is restricted symptomatic treatment and to the prevention of possible secondary bacterial infections. The aim of this study is to investigate the seroprevalence of equine influenza in Algeria in order to obtain an objective information on the situation of the disease in this country, and the distribution of seropositive horses in different regions of the country according to the age, the sex and the bred of the animals. In addition, this work presents the isolation and molecular characterization of the virus responsible for the outbreak of equine influenza that surged in 2011 in Tiaret.

Keywords: Equine Influenza Virus (EIV), sub-type 1 (H7N7) and 2 (H3N8), Clade 2, Seroepidemiology, Inhibition of Haemagglutination (HI), qRT-PCR, Phylogeny, Horse, Algeria.

ملخص

فيروس إنفلونزا الخيول (EIV)، ينتمي إلى أسرة *Orthomyxoviridae*، جنس الإنفلونزا، نوع A. يتميز فيروس إنفلونزا الخيول بالانتشار السريع، ويعتبر من الأمراض التي تشكل خطرا اقتصاديا على تربية الخيول. يوجد نوعان فرعيان متميزان H7N7 و H3N8 كعوامل معدية للخيول، ولكن فقط هذا الأخير لا يزال ينتقل و يتطور. في الجزائر، البحث والتعرف على أمراض الخيول المختلفة غير معتمدة. لا يوجد في الجزائر برنامج وطني لمكافحة انتشار فيروس إنفلونزا الخيول ويقتصر العمل الوقائي فقط من الخدمات البيطرية على تنفيذ علاج الأعراض ومحاربة أي التهابات جرثومية ثانوية. الهدف من هذه الدراسة هو التحقيق في الانتشار المصلي لإنفلونزا الخيول في الجزائر من أجل الحصول على معلومات موضوعية عن حالة المرض في البلاد. وكذا توزيع الخيول ايجابية المصل في مناطق مختلفة من البلاد من جهة، والعمر والجنس وعرق الحيوانات من جهة أخرى. وعلاوة على ذلك، يقدم هذا العمل التحديد و التوصيف الجيني للفيروس المسؤول عن وباء إنفلونزا الخيول في عام 2011 في تيارت.

الكلمات المفاتيح : فيروس انفلونزا الخيول (EIV) ، النوع الفرعي 1 (H7N7) و 2 (H3N8) ، كلاب 2 ، السيرولوجية الوبائية ، تثبيط تراص كريات الدم الحمراء (IHA) ، qRT-PCR ، نسالة، الحصان، الجزائر

Université El-Hadj Lakhdar – Batna
Institut des Sciences Vétérinaires et des Sciences Agronomiques
Département Vétérinaire

Nom : LAABASSI		Adresse : Cité des 360 logements, Bloc 9, n°82, LSP-AADL, Hamla- 05000, Batna
Prénom : Farouk		
Date et lieu de naissance : 08/07/1979 à Ouled Fatma- Batna		Email : flaabassi@yahoo.fr
Titre de la thèse : Étude de l'influence de l'infection par les virus de la grippe et de la rhinopneumonie sur certains paramètres sanguins du cheval de course		
Nature du Diplôme : Doctorat Es-Sciences		
Résumé Le virus influenza équin (EIV), appartient à la famille des <i>Orthomyxoviridae</i> , genre <i>Influenzavirus</i> , type A. L'EIV se caractérise par une dissémination très rapide et provoque une maladie à fort enjeu économique pour la filière équine. Deux sous-types distincts H7N7 et H3N8 sont décrits comme agents infectieux des équidés, mais seul ce dernier continue de circuler et d'évoluer. En Algérie, la recherche et l'identification des différentes pathologies équines ne sont pas prises en charge. Il n'existe aucun programme national permettant de lutter contre la propagation du virus influenza équin et l'unique action des services vétérinaires se limite à la mise en œuvre d'un traitement symptomatique et à la gestion d'éventuelles infections bactériennes secondaires. L'objectif de cette étude est d'étudier la séroprévalence de la grippe équine en Algérie afin d'obtenir une information objective sur la situation de la maladie dans ce pays, ainsi que la répartition de chevaux séropositifs dans les différentes régions du pays en fonction de l'âge, du sexe et de la race des animaux. De plus, ce travail présente la mise en évidence et la caractérisation moléculaire du virus responsable de l'épizootie de grippe équine qui avait sévi en 2011 à Tiaret.		
Mots clés : Virus de la Grippe Équine (EIV), Sous-type 1 (H7N7) et 2 (H3N8), Clade 2, Séro-épidémiologie, Inhibition de l'hémagglutination (IHA), qRT-PCR, phylogénie, Cheval, Algérie.		
Laboratoire : Laboratoire Environnement, Santé et Production Animale (LESPA)		
Directeur de Thèse : Bakir Mamache	Grade : Professeur	Université d'origine : Batna
Membres de Jury	Grade	Université d'origine
Président : S. MEHENNAOUI	Professeur	Batna
Examineur : D. GUETARNI	Professeur	Blida
Examineur : R. OUZROUT	Professeur	El-Tarf
Examineur : M. BENSOUILAH	Professeur	Annaba
Examineur : L. AOUN	Professeur	El-Tarf
Date de soutenance : 12/03/2013		