

Université de Montréal

Détermination de l'importance relative des différentes espèces d'oiseaux, hôtes principales
pour la transmission du virus du Nil occidental dans le sud du Québec

Par

Ludivine Taieb

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de *Maîtrise ès sciences* (M. Sc.)
en Sciences vétérinaires, option épidémiologie

Mai 2021

© Ludivine Taieb, 2021

Université de Montréal

Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

Étude des espèces d'oiseaux hôtes principales pour le virus du Nil occidental dans le sud du Québec

Présenté par

Ludivine Taieb

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Patrick Leighton

Président-rapporteur

Antoinette Ludwig

Directrice de recherche

Carl A. Gagnon

Codirecteur

Philippe Berthiaume

Membre du jury

Résumé

Le virus du Nil occidental (VNO) est un arbovirus principalement transmis par les moustiques. Le cycle de transmission enzootique implique généralement une variété d'espèces d'oiseaux sur lesquelles se nourrissent de façon préférentielle divers moustiques, les principaux vecteurs enzootiques au Québec étant les moustiques du genre *Culex* (c'est-à-dire *Culex pipiens* et *Cx. restuans*). Des cas d'infection humaine par le VNO surviennent sporadiquement chaque année au Québec et on sait peu de choses sur les facteurs qui déterminent l'ampleur des épidémies chez les humains. Malgré l'existence de nombreuses études sur le virus du Nil occidental (VNO) aux États-Unis, y compris sur le rôle de réservoir des espèces d'oiseaux, et sur les changements alimentaires du moustique *Culex* (des oiseaux vers les mammifères), peu d'études équivalentes existent dans les régions voisines du Canada où le VNO est endémique.

Ce travail vise à déterminer l'importance relative des différentes espèces d'oiseaux dans la transmission du VNO dans le sud du Québec. Nous nous sommes concentrés sur les espèces aviaires du corridor de migration de l'Atlantique Est (selon la base de données Avibase). Les espèces d'oiseaux ont ensuite été triées et sélectionnées en fonction de ce qui suit : 1) les taux de mortalité aviaire dus au VNO signalés dans les données de surveillance locale du Réseau canadien pour la santé de la faune, 2) la séroprévalence et la compétence des réservoirs du VNO en Amérique du Nord (d'après la littérature), 3) les estimations locales de la densité des oiseaux (d'après les données ebird) et 4) les données d'une étude sur les repas sanguins de *Culex pipiens* / *Cx. restuans* saisies entre 2008 et 2013 chez des moustiques de la région de Montréal. L'analyse a généré une liste de 67 espèces d'oiseaux potentiellement impliquées dans la circulation du VNO dans notre zone d'étude et nous avons émis des hypothèses quant à la contribution relative à l'amplification du VNO. Cette étude permettra de mieux comprendre les facteurs susceptibles d'influencer la circulation du VNO dans le sud du Québec et sera utile aux futures études de modélisation de la transmission enzootique du VNO.

Mots-clés : Virus du Nil Occidental, oiseaux sauvages, préférences alimentaires *Culex*, éco-épidémiologie, Québec.

Abstract

West Nile virus (WNV) is an arbovirus that is primarily transmitted by mosquitoes. The enzootic transmission cycle typically involves a variety of bird species and mosquitoes that preferentially feed upon them. The main enzootic vectors in Québec are mosquitoes in the genus *Culex* (i.e., *Culex pipiens* and *Cx. restuans*). Cases of WNV occur sporadically each year in Québec and little is known about the factors that drive the magnitude of human outbreaks. Despite many studies on West Nile Virus (WNV) in the US, including the reservoir role of bird species and the summer shifts of the *Culex* mosquito, feeding from birds to mammals, there have been few equivalent studies in the neighboring regions of Canada where WNV is endemic.

Birds are considered the main hosts of WNV amplification and dispersion. In this study, we aim to determine the relative importance of different bird species in WNV transmission in southern Quebec. We focused on the East Atlantic migration corridor of different avian species (according to the Avibase database). Bird species were then sorted and selected according to : 1) rates of avian mortality from WNV reported in local surveillance data from the Canadian Wildlife Health Cooperative; 2) seroprevalence and reservoir competence for WNV in North America (from the literature); 3) local bird density estimates (from ebird data), and 4) data from a blood meal analysis study on *Culex pipiens/Cx.restuans* mosquitoes captured between 2008 and 2013 in Montreal region. The analysis generated a list of 67 bird species potentially involved in the circulation of WNV in our study area and hypotheses were generated regarding the relative contribution to WNV amplification. This study will improve our understanding of the factors that may impact WNV circulation in southern Québec and will be useful to future modelling studies of enzootic WNV transmission.

Keywords : West Nile, wild birds, *Culex* feeding/host preference, eco-epidemiology, Québec.

Table des matières

Résumé	1
Abstract.....	2
Table des matières.....	3
Liste des tableaux	8
Liste des figures	9
Liste des sigles et abréviations	11
Remerciements.....	15
Introduction	17
Recension de la littérature	23
Partie 1 – Le virus du Nil Occidental au Québec	24
Le Virus	24
Structure.....	24
Diversité génétique	25
Les vecteurs.....	26
Espèces vectrices du VNO en Amérique du Nord	26
Cycle de vie des vecteurs	27
Milieu de vie des vecteurs.....	28
Transmission du VNO	29
Les hôtes.....	30
Les oiseaux, hôtes naturels du VNO.....	30
Oiseaux : amplificateurs du virus	30
Oiseaux : disperseurs et transporteurs du virus	30

Oiseaux : réservoirs du virus	31
Oiseaux : sentinelles du virus	31
Repas sanguins des vecteurs.....	32
Les mammifères, hôtes accidentels du VNO	32
Évolution des cas humains	33
Évolution des cas humains au Canada	33
Évolution des cas humains au Québec.....	35
Mise en parallèle des cas chez les oiseaux et les humains au Québec.....	36
Partie 2 – Analyse des repas sanguins effectués par les moustiques.....	38
Méthodes utilisées	38
Méthodes de collecte des moustiques	38
Analyses de laboratoire.....	41
Extraction de l’ADN	41
Identification de l’origine des repas sanguins de moustiques.....	41
Modélisation des préférences alimentaires de <i>Culex pipiens-restuans</i>	44
Recensement des espèces aviaires présentes sur la zone d’étude	44
Calcul des paramètres de préférences alimentaires.....	45
Préférences alimentaires de <i>Culex pipiens-restuans</i>	47
État des lieux des préférences alimentaires de <i>Culex pipiens-restuans</i> en Amérique du Nord et en Europe.....	47
Changement des préférences alimentaires de <i>Culex pipiens-restuans</i> au cours de la saison et impact possible sur la transmission d’un agent pathogène.	49
Partie 3 – Mortalité et séroprévalence du virus du Nil occidental dans l’avifaune en Amérique du Nord.....	52
Évolution de la mortalité des oiseaux en Amérique du Nord	52

Sensibilité des espèces aviaires face au VNO.....	53
Modes de transmission de l’infection chez les oiseaux	54
Tests diagnostiques effectués sur les oiseaux	55
Séroprévalence.....	56
Détermination de la séroprévalence	57
Variation de la séroprévalence	59
Partie 4 – Compétences vectorielles et compétences d’hôte	62
Compétence vectorielle	62
Réplication.....	63
Dissémination.....	64
Quantification de la compétence vectorielle.....	66
Facteurs d’influence de la compétence vectorielle	68
Capacité vectorielle.....	69
Compétence d’hôte.....	70
Variabilité de la compétence d’hôte.....	71
Capacité d’hôte	72
Variabilité de la capacité d’hôte.....	72
Présentation de l’article.....	74
Article – Bird Species Involved in West Nile Virus Epidemiological Cycle in Southern Québec .75	
Abstract	75
1. Introduction.....	76
2. Materials and Methods	79
2.1. Study Area	79
2.2. Identification of Priority List of Wild Bird Reservoir Species	80

2.2.1. Wild Bird Mortality Data: List L1	81
2.2.2. Blood Meal Data: List L2.....	81
2.2.3. Literature Review: List L3	84
3. Results	86
3.1. Wild Bird Mortality Data: List L1	86
3.2. Blood Meal Analysis: List L2	86
3.3. Literature Review: List L3	94
3.4. Final List: Lf.....	95
4. Discussion	96
5. Conclusions.....	98
Author Contributions	98
Funding.....	98
Acknowledgments.....	98
Conflicts of Interest	99
References.....	99
Discussion Générale.....	107
Préférence alimentaire des moustiques	107
Préférences aviaires	107
Changement des préférences alimentaires	108
Liste des espèces d'oiseaux sauvages potentiellement impliquées dans le cycle épidémiologique du VNO dans la région de Montréal.	110
Caractéristiques aviaires liées au VNO	110
Séroprévalence.....	110
Mortalité aviaire.....	111

Migration des espèces aviaires	113
Espèces d'oiseaux potentiellement candidates à l'amplification du VNO.....	114
Limites	115
Taux de mortalité aviaire	115
Revue de littérature sur la séroprévalence et la compétence d'hôte des réservoirs du VNO	116
Estimations locales de la densité des oiseaux.....	117
Donnée de l'étude effectuée sur les repas sanguins	118
Création de la liste d'espèces potentiellement impliquées dans le cycle du VNO au Québec	118
Conclusion.....	119
Références bibliographiques	121

Liste des tableaux

Tableau 1. – Valeurs minimales et maximales de séroprévalence répertoriées dans la littérature.....	59
Tableau 2. – Taux d’infection et de dissémination pour les moustiques oralement exposés au VNO.....	67
Tableau 3. – Search strategy for the literature review.	84
Tableau 4. – Results of the molecular analysis of blood meals.	87
Tableau 5. – Characteristics of bird species affected by WNV in the Montréal area.....	90

Liste des figures

Les figures provenant de la littérature ont été utilisées selon les règles de droit d'auteurs édictées par les journaux (licence d'attribution Creative Commons).

Figure 1. – Carte illustrant la présence du VNO à travers le monde	18
Figure 2. – Schéma du cycle de transmission du VNO	19
Figure 3. – Représentations schématiques de l'ARN génomique du virus du Nil occidental. ...	25
Figure 4. – Cycle de vie du moustique	27
Figure 5. – Evolution du nombre de cas humains au Canada	34
Figure 6. – Cartographie de cas humains du VNO entre 2015 et 2018	35
Figure 7. – Nombre de cas humain d'infection par le VNO et taux incidence selon la présentation clinique, Québec, 2003 – 2019	36
Figure 8. – Évolution des cas humains et oiseaux au Québec entre 2002 et 2017	37
Figure 9. – Schéma de la réplication du VNO dans le cytoplasme d'une cellule hôte de moustique.....	64
Figure 10. – Vue d'ensemble schématique des barrières intestinales mises en place par le moustique.....	65
Figure 11. – Compétences d'hôtes associées aux espèces recensées dans les repas sanguins de femelles <i>Culex pipiens-restuans</i> engorgées (Komar, Langevin et al. 2003, Kilpatrick, LaDeau et al. 2007, Wheeler, Barker et al. 2009).	71
Figure 12. – Yearly number of cases of West Nile virus (WNV) infection in humans and number of dead birds positive to WNV in Québec 2002–2017.....	77
Figure 13. – Study area with locations of collection of dead birds (CWHC), bird watching and counts (EPOQ) and collection of engorged female <i>Culex pipiens–restuans</i> on the island of Montréal, Québec.	80
Figure 14. – List L1: ranked list ($n = 18$) of dead birds found by WNV passive bird surveillance.....	86
Figure 15. – List L2: ranked list ($n = 23$) of bird species found from analysis of <i>Culex pipiens– restuans</i> (CPR) blood meals.	88

Figure 16. – Weekly proportion of *Culex pipiens–restuans* blood meals taken from birds of all species.....93

Figure 17. – Selection process of articles and the result of the literature review.....94

Figure 18. – List L3: ranked list ($n = 53$) of bird species found from the literature review.....95

Liste des sigles et abréviations

ADN = Acide Désoxyribonucléique // DNA = Deoxyribonucleic Acid

ADNmt = Acide Désoxyribonucléique mitochondrial

Ae = Aedes

ARN = Acide ribonucléique // RNA = Ribonucleic Acid

ASPC = Agence de Santé Publique du Canada // PHAC = Public Health Agency of Canada

BGS trap = BG-Sentinel trap

C = Capside

CA = Californie

CDC = Center for Disease Control

COI = Cytochrome c oxidase I

CPR = Culex pipiens-restuans

Cyt b = Cytochrome b

CWHC = Canadian Wildlife Health Cooperative

CO₂ = Dioxyde de carbone

Cx = Culex

E = Enveloppe

ELISA = Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

données EPOQ = données d'étude des populations d'oiseaux du Québec

EVS trap = Heavy Duty Encephalitis Vector Survey trap

Fc = Fragment crystallized

g = gramme

INSPQ = Institut National de Santé Publique du Québec

km = kilomètre

km² = kilomètre carré

m = mètre

M = Membrane

Max = valeur maximale

Min = valeur minimale

mL = millilitre

mm = millimètre

N (suivi d'un nombre) = Nombre ou taille de l'échantillon

N = Nord, désigne la zone Est des États-Unis entre le Maine et la Virginie

NADH = Hydrure de nicotinamide adénine dinucléotide

ND(1) = Sous-unité de la NADH déshydrogénase

NS(1) = Non Structural glycoprotein

OH = Ohio

ORF = Open Reading Frame

PNOC = Prepronociceptin gene

PCR = Polymerase Chain Reaction

prM = pré-Membrane

QC = Québec

RAMP = Rapid Analyte Measurement Platform

RE = Réticulum endoplasmique

RT-PCR = Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction

S = Sud, désigne la zone Est des États-Unis entre la Caroline du Nord et la Floride

Se = Sensibilité

Sp = Spécificité

UFP = Unités Formatrice de Plages // PFU = Plaque-forming unit

UK = United Kingdom ou Royaume-Uni

USA = United States of America ou États-Unis

VNO = virus du Nil occidental // WNV = West Nile Virus

WI = Wisconsin

*« C'est le temps que tu as perdu pour ta rose
qui fait ta rose si importante. »*

Antoine de Saint-Exupéry – Le Petit Prince (1943)

À ma Mère-Veille et mon Hors-Père.

Et à Tioutiou aussi, un peu.

Remerciements

Je tiens à remercier vivement ma directrice, Antoinette Ludwig et mon co-directeur Carl A. Gagnon pour leur encadrement, leurs conseils et leur grande patience.

En particulier, je remercie Dominique J. Bicout pour son implication sans faille, sa persévérance et son écoute. Il est l'un des plus grands artisans ayant permis l'achèvement de ce travail, qui ne fut pas sans embuches. Ma reconnaissance éternelle.

Je remercie également, André Ravel, membre de mon comité conseil, pour son soutien et ses conseils avisés.

Ce travail n'aurait pas pu être réalisé sans la participation et l'expertise de nombreuses personnes et en particulier Nick H. Ogden, Robbin L. Lindsay, Mahmood Iranpour, Serge-Olivier Kotchi, Philippe Berthiaume ainsi que toutes les personnes impliquées dans la collecte de données sur le terrain.

Merci à mes professeurs pour leur enseignement précieux et leur disponibilité.

Sans pouvoir tous les citer, je remercie chaleureusement l'ensemble des membres du GREZOSP et son directeur André Ravel pour leur accueil, leurs discussions, leur bonne humeur et leur bonne ambiance durant ces presque quatre ans passés près d'eux. Je vous serai éternellement reconnaissante de m'avoir gratifiée du prix Lucie-Dutil. Je remercie également les membres du Conseil Scientifique, du Comité des Echanges, du Comité Web et communication : Patrick, Cécile, Marie-Laure, Hélène B-R, Marion, Audrey, Émilie, Ariane, Catherine, Liliane, Manon, Marie-Josée, Julie, Patricia, Philippe F., Farouk, pour les nombreux moments à oeuvrer ensemble pour faire du GREZOSP un lieu si stimulant et de partage. Un grand merci à *Pandemonium* porté par Michelle, Emilie, Ariane, Nick et Michel pour tous ces bons moments en musique. Ce fut une vraie respiration au cours de ma dernière année avec vous.

Merci à l'ensemble du groupe étudiant et en particulier à Jérôme, Hélène, Marion, Agathe, Rindra, Camille, Carol-Anne, Ariane, Yi, Audrey, Léa, Daryna pour tous ces bons moments passés

ensemble que ce soit dans et hors des murs du GREZOSP et aussi pour leur confiance durant ces quelques années de représentation au sein du Conseil Scientifique.

De l'autre côté de l'océan, je tiens à remercier pour leur accueil et leur disponibilité ceux qui furent mes collègues et parfois plus au cours de mes quelques mois passés à Grenoble : Charlotte, Franck, Sylvette et bien sûr Anne Maître.

Un grand merci particulier et plus personnel va à quelques personnes très chères pour leur soutien sans faille, leur écoute, leur épaule parfois et pour nos bons moments ensemble au *Zaricot* notamment : Marion, Hélène, Agathe, Ving', Catherine, Mathieu (*Ah ok !*), Julie et bien sûr Jérôme "*mon petit frère*".

À Lili, Gege, Guy et Wif-Wif, merci pour tout. Merci de m'avoir ouvert les portes de votre famille. J'ai hate de vous faire découvrir la mienne !

Aux amis (vous vous reconnaissez), à la famille (ma Team *La La Landes*) et aux *Peakers* de France et du Canada qui ont suivi mes aventures au Québec ; à mes supers-colocs (Véro, Roxane, Juliette, Séléna et les autres), aux nouveaux copains (Victor et Laurie) qui ont fait de mon quotidien un truc plus fun, merci d'avoir été là en tout temps que ce soit pour des randos, des matinées rugby, des levers aux aurores pour nos nombreuses courses ou plein d'autres bons moments. Virtuellement ou en présentiel, merci d'avoir été toujours plein de sollicitude et de motivation.

À Pépé, merci pour tes "*On lâche rien !*". À Mémé, qui aurait été si fière. À mon Aude, qui m'a laissée partir sans regrets.

À Prunelle, merci pour tous ces petits messages et pensées qui faisaient toujours du bien.

And the last but not least, parce que je ne serais rien sans vous – littéralement. À Maman et Papa : ma *Mère-Veille* et mon *Hors-Père*. Merci pour votre amour et votre soutien indéfectible, merci de m'avoir suivie et supportée dans cette folle aventure, merci de croire en moi et de m'avoir toujours rattrapée quand je tombais. Je suis extrêmement chanceuse de vous avoir et je vous dédie ce travail.

Introduction

Le virus du Nil occidental (VNO) est un arbovirus à ARN négatif de la famille *Flaviviridae* et du genre *flavivirus* au même titre que le virus Zika, le virus de la dengue ou le virus de l'encéphalite de Saint-Louis. Identifié et isolé pour la première fois en Ouganda, en 1937, il est l'un des virus les plus dispersés sur la Terre, comme l'illustre la Figure 1 (Chancey, Grinev et al. 2015). Le virus est notamment très présent en Afrique, au Moyen-Orient et en Asie Occidentale.

En Europe et notamment au niveau du bassin méditerranéen, de nombreuses épidémies d'encéphalites liées au VNO ont été répertoriées au cours des années 90 (Dauphin, Zientara et al. 2004). De façon générale, il est établi que le virus est capable de se maintenir plusieurs années successives dans une région donnée et ainsi survivre à l'hiver dans les pays tempérés, tel qu'observé en Europe (Jourdain, Schuffenecker et al. 2007) ou au nord-est des États-Unis, les années ayant suivi son introduction (Bicout 2013). Le virus ne se maintient toutefois pas toujours et peut nécessiter une réintroduction qui se fait par la migration d'oiseaux (Hayes 1988, Rappole, Derrickson et al. 2000).

En Amérique du Nord, la première épidémie enregistrée date de 1999 à New York avec 61 cas d'encéphalites virales rapportées et 7 décès (Garmendia, Van Kruiningen et al. 2001). Des encéphalites équine et une grande mortalité de plusieurs oiseaux, essentiellement des corneilles d'Amérique (*Corvus brachyrhynchos*) et des oiseaux exotiques du zoo du Bronx sont également observés (Garmendia, Van Kruiningen et al. 2001). Ceci s'expliquant notamment par la forte virulence du virus, qui permet une meilleure infection et dissémination chez les hôtes lors d'un repas sanguin (Ciota, Ehrbar et al. 2013). En 4 ans (1999-2004), on observe une expansion du virus à l'ensemble des États-Unis (de l'est vers l'ouest), puis sur une grande partie du continent américain : au nord avec le Canada en 2002 (Gancz, Barker et al. 2004) et au sud avec les Îles Caïman en 2001 ; le Mexique, la Guadeloupe, la Jamaïque et la République Dominicaine en 2002 ; Cuba, les Bahamas, Belize, et le Salvador en 2003 ; la Colombie, le Venezuela, le Costa Rica, le Guatemala Trinidad et Tobago, Haiti et Porto Rico en 2004 ; le Venezuela et l'Argentine en 2005 ; le Nicaragua en 2006 et le Brésil en 2009 (Elizondo-Quiroga and Elizondo-Quiroga 2013, Vieira, Romano et al. 2015).

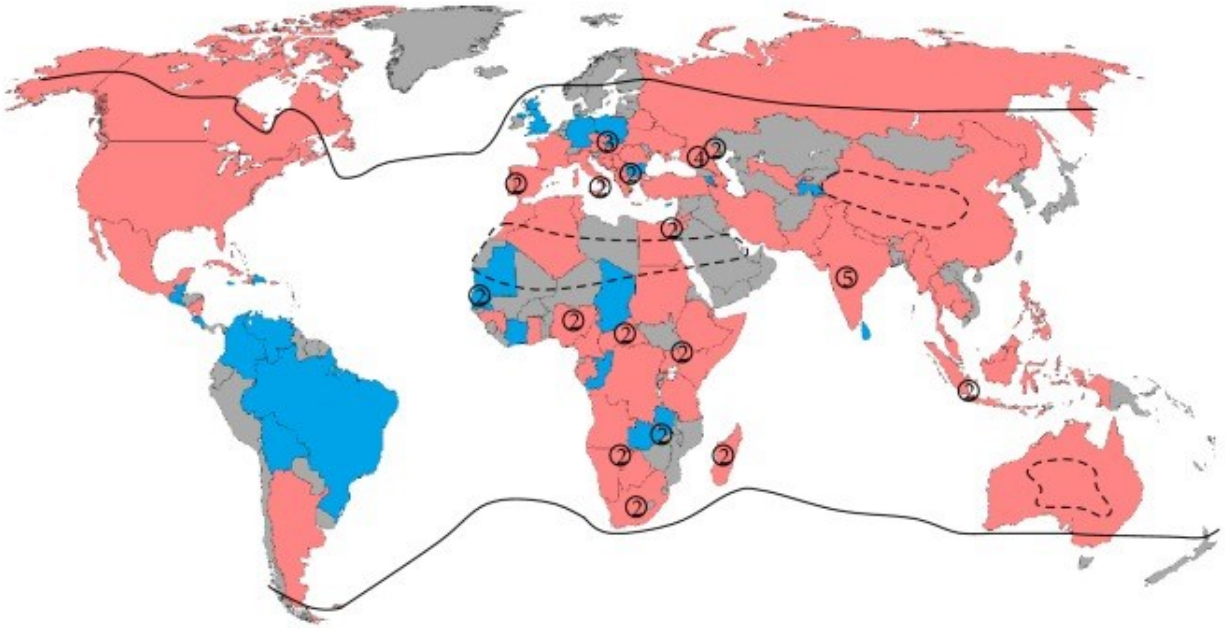


Figure 1. – Carte illustrant la présence du VNO à travers le monde

Répartition mondiale du VNO par pays : en rouge, les zones présentant des cas ou une séropositivité humaine ; en bleu, les zones présentant des cas ou une séropositivité non humaine ou vectorielle ; en gris, les zones où aucune donnée ou aucun résultat positif n'a été signalé. Les lignes noires représentent la distribution mondiale des principaux vecteurs moustiques du VNO, à l'exclusion des zones de climat extrême dénotées par des lignes en pointillés. Les chiffres entourés indiquent la présence signalée de lignées virales du VNO autres que la lignée 1. Pour le Japon, la Corée du Sud, la Finlande et la Suède, la séropositivité pour le VNO n'a été détectée que chez des oiseaux non-résidents, ce qui n'a pas été considéré comme révélateur d'une transmission locale. Issu de (Chancey, Grinev et al. 2015)

Le virus du Nil Occidental est intégré dans un cycle épidémiologique complexe (Figure 2) qui implique des vecteurs, les moustiques et des hôtes amplificateurs comme les oiseaux ou accidentels et terminaux comme les mammifères (humains et chevaux principalement) (Work, Hurlbut et al. 1953, Taylor, Work et al. 1956, Zeller and Schuffenecker 2004). Amphibiens et reptiles peuvent aussi être impliqués dans le cycle épidémiologique comme hôtes, sachant que la proportion de repas sanguins de *Culex pipiens* peut être importante chez ces espèces (Apperson,

Hassan et al. 2004), mais ils ne peuvent être considéré comme hôtes amplificateurs en raison d'une faible virémie ou indétectable pour la plupart de ces espèces (Klenk and Komar 2003) hormis chez les alligators juvéniles (*Alligator mississippiensis*) qui peuvent présenter des virémies élevées de longues durées (Klenk, Snow et al. 2004). La transmission du virus se fait par les piqûres de moustiques infectés et c'est le cycle oiseau – moustique, qui permet un maintien de l'infection dans la nature où les mammifères, tels que les chevaux et humains constituent des hôtes accidentels et terminaux, qui ne peuvent être impliqués dans le cycle de transmission en raison notamment de leur faible virémie (Dauphin, Zientara et al. 2004).

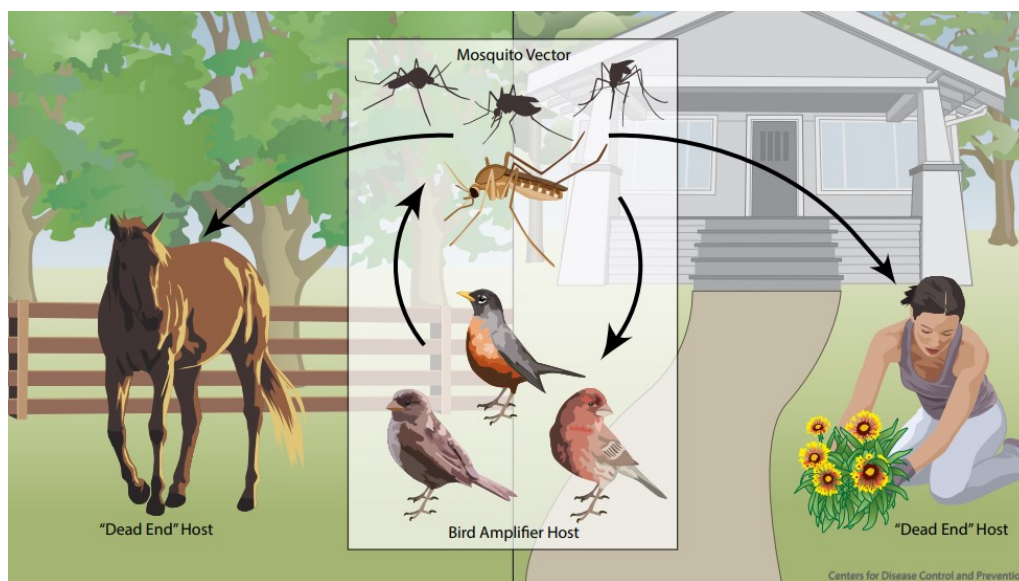


Figure 2. – Schéma du cycle de transmission du VNO
 Issu de (CDC.gov 2018)

En raison de profils différents selon les espèces, les oiseaux, en tant qu'hôtes naturels du virus, apportent de la complexité au cycle épidémiologique et sont ainsi intéressants à étudier. Les espèces aviaires dotées d'une virémie suffisamment élevée et longue peuvent ainsi jouer le rôle de réservoir amplificateur du virus. C'est le cas notamment des passeriformes comme le merle d'Amérique (*Turdus migratorius*) ou la Corneille d'Amérique (Work, Hurlbut et al. 1955, Langevin, Bunning et al. 2001, Komar, Langevin et al. 2003, Reisen, Fang et al. 2005), au contraire du cardinal rouge (*Cardinalis cardinalis*) ou des oiseaux de la famille des *Mimidae*, tels que le moqueur

polyglotte (*Mimus polyglottos*), le moqueur roux (*Toxostoma rufum*) ou le moqueur chat (*Dumetella carolinensis*) (Levine, Mead et al. 2016).

Les oiseaux peuvent également jouer un rôle majeur dans le transport et la dispersion du virus non seulement dans une aire restreinte (Ward, Raim et al. 2006) mais également sur de longues distances du fait de leurs mouvements migratoires (Rappole and Hubálek 2003, Jourdain, Gauthier-Clerc et al. 2007) et donc introduire ou réintroduire le virus dans de nouvelles régions (Komar, Langevin et al. 2003).

D'autres espèces jouent le rôle de sentinelles en servant d'indicateurs biologiques quant à l'existence d'une période d'activité virale et ce avant que l'on atteigne la phase d'émergence du virus (Rodhain 1998). Par exemple, dans les années qui ont suivi l'introduction du virus, au nord-est de l'Amérique, deux espèces facilement détectables et de densité importante dans les zones urbaines et résidentielles ont pu faire office de sentinelles : la corneille d'Amérique et le geai bleu (*Cyanocitta cristata*) (Marra, Griffing et al. 2004). L'une et l'autre ont présenté une grande sensibilité au virus lors de l'épidémie new yorkaise de 1999 (Komar, Panella et al. 2001) et dans les années qui ont suivi (Thomas-Bachli, Pearl et al. 2020).

Les humains font parti des hôtes accidentels du virus et présentent des symptômes cliniques relativement rares : environ 80% des cas humains sont asymptomatiques, mais le virus peut aussi provoquer une fièvre de type grippal (25% des cas symptomatiques), des symptômes neurologiques graves de type encéphalites ou méningites chez 20 à 43% des cas symptomatiques selon les programmes de surveillance établis par l'Agence de Santé Publique du Canada (ASPC 2012-2020). Il a également été reporté qu'une encéphalite peut occasionner la mort dans 10-30% des cas (Ouhoumanne, Lowe et al. 2018). De plus, comme pour la plupart des autres infections virales transmises par les moustiques, des épidémies peuvent se produire chaque année, mais diffèrent considérablement par leur ampleur et leur emplacement géographique. Cela est observé notamment aux États-Unis où l'activité du VNO est observée chaque année, mais de grandes épidémies ne sont constatées que tous les 8 à 10 ans (Barrett 2018).

En raison de la gravité des maladies pouvant être occasionnées par le virus, de la sporadicité de la présence du virus avec l'existence des vagues épidémiques de plus grande intensité et l'absence

de traitement spécifique ou de vaccin, cela fait du VNO un véritable problème de santé publique (INSPQ 2016, Habarugira, Suen et al. 2020). De plus, au Québec, peu de littérature s'intéresse à l'impact de l'oiseau dans le cycle épidémiologique du VNO et notamment à son rôle dans le transport et la propagation du virus dans la province francophone. C'est pourquoi, il est essentiel de mieux comprendre comment le virus circule dans le sud du Québec, de déterminer les acteurs aviaires en jeu dans ce système épidémiologique, ainsi que leur rôle plus particulièrement.

L'objectif principal de ce travail de Maîtrise est donc de déterminer l'importance relative des différentes espèces aviaires dans le maintien et la transmission du virus du Nil dans le sud du Québec en établissant une liste des espèces d'oiseaux susceptibles de jouer un rôle dans la circulation du VNO au sud du Québec, et ce afin de pouvoir remédier au manque de connaissance que l'on a, au sud du Québec, sur les oiseaux impliqués dans le cycle épidémiologique du VNO et sous quelle forme. Cette liste est basée sur l'historique des taux de mortalité aviaire dus au VNO signalés dans les données de surveillance locale du Réseau canadien pour la santé de la faune ; des estimations locales de la densité des oiseaux (d'après les données ebird) ; des données d'une étude sur les repas sanguins de *Culex pipiens* / *Cx. restuans* obtenues entre 2008 et 2013 chez des moustiques de la région de Montréal et des données de littérature de séroprévalence et compétence d'hôte des espèces aviaires impliquées dans le VNO en Amérique du Nord. En tête de cette liste, on s'attend à retrouver notamment le merle d'Amérique, considéré comme superpropagateur du VNO et parmi les préférences alimentaires de CPR connues en Amérique du Nord (Levine, Mead et al. 2016, Owen, Landwerlen et al. 2021), le geai bleu et la corneille d'Amérique, en raison de leur importance en tant qu'indicateurs de la présence du virus au Canada, au début des années 2000 (CWHC 2016), ainsi que le moineau domestique, en raison de son abondance (Komar 2001). En raison du caractère sporadique du virus dans notre zone d'étude, on peut supposer que le virus est ramené chaque année au Québec par les espèces migratrices arrivant du sud et que les espèces résidentes sont là pour amplifier localement le virus, causant une épidémie. Ainsi pour chaque espèce de cette liste, le statut migratoire, l'aire d'hivernage et de ponte ainsi que la période de migration sont également renseignés afin d'établir le profil écologique des différentes espèces.

Pour cela, deux sous-objectifs viennent alimenter l'objectif principal.

Il s'agira dans un premier temps d'établir la susceptibilité des espèces d'oiseaux au VNO et ce à partir des données issues de la littérature concernant le Québec ainsi que les états américains du couloir migratoire atlantique, mais également des données collectées sur le terrain au Québec, telles que décrites ci-dessus.

Le deuxième sous-objectif de ce travail visera à caractériser les préférences alimentaires du complexe d'espèces *Culex pipiens-restuans* (CPR) en matière d'espèces aviaires, relativement à l'abondance de ces oiseaux dans la zone d'étude. En raison de l'existence d'épidémie chez les humains au cours de la saison estivale et sachant que le moustique *Culex pipiens* est principalement ornithophile, on suppose également que sa préférence alimentaire aille en faveur des mammifères au cours de l'été.

Recension de la littérature

Cette recension de la littérature a pour objectif de faire une synthèse de l'état des connaissances sur le VNO au Québec. La première partie présente le virus du Nil occidental au Québec et son épidémiologie. La deuxième partie se focalise sur les analyses des repas sanguins effectués par les moustiques et présente les principales méthodes utilisées, ainsi que les principaux résultats relevés au sein des états situés sur le couloir migratoire Atlantique du continent Américain. La troisième partie s'attarde sur la mortalité et la séroprévalence au VNO dans l'avifaune en Amérique du Nord. Et enfin la quatrième partie fait état de nos connaissances sur les compétences vectorielles et compétences d'hôte à pouvoir retransmettre le VNO après avoir été infecté.

En raison de l'absence d'études effectuées sur les oiseaux au Québec ou à l'Est du Canada, les données présentées issues de la littérature concernent au mieux les états du Nord-Est des États-Unis qui présentent une écologie similaire à celle du Sud du Québec. Les oiseaux migrateurs qui circulent au Québec proviennent du corridor de migration de l'Atlantique Est, les données de littérature provenant des états américains situés sur cette voie ont également été intégrés.

Partie 1 – Le virus du Nil Occidental au Québec

Dans cette première partie, un état des lieux des connaissances est réalisé sur l'épidémiologie virus du Nil Occidental et les différents acteurs mis en jeu dans le cycle épidémique, à savoir le virus, les vecteurs, les hôtes. Enfin, nous reviendrons sur les risques du VNO pour l'homme et de l'évolution des cas humains au Canada.

Le Virus

En tant que *flavivirus*, le virus du Nil Occidental est un virus à ARN simple brin positif.

Structurellement parlant, il prend la forme d'une particule sphérique d'environ 50 nm de diamètre contenant la nucléocapside en son centre, c'est-à-dire l'ARN viral entouré des protéines de la capsid. Une enveloppe l'entoure sur laquelle peuvent se fixer des protéines virales et membranaires, dont ces dernières proviennent de la membrane cytoplasmique de la cellule hôte (Monath, Arroyo et al. 2001, Campbell, Marfin et al. 2002, Mukhopadhyay, Kim et al. 2003). La surface externe du virus est d'aspect rugueux en microscopie électronique.

Structure

Le brin d'ARN est constitué de 11000 à 12000 nucléotides. Ses gènes codent sept protéines non structurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5) et trois protéines de structure, soient la capsid (C), la membrane (M) et l'enveloppe (E), tels que l'on peut le voir dans la figure 3. Ce sont ces trois protéines de structures qui jouent le plus grand rôle dans la réplication du virus, la maturation du virion et la synthèse de nouvelles protéines et enzymes virales (Monath, Arroyo et al. 2001, Campbell, Marfin et al. 2002, Guzman, Kouri et al. 2002).

La protéine C de la capsid protège le génome du virus. Il s'agit du premier polypeptide synthétisé par le nouveau virus. La protéine M permet le contrôle de la fusion du virus. Et l'enveloppe virale E est responsable de différentes propriétés biologiques du virus comme l'attachement aux cellules, impliqué dans le choix des hôtes et le tropisme tissulaire, l'hémagglutination des érythrocytes, l'induction de la réponse immunitaire et la production d'anticorps neutralisants par les organismes infectés (Guzman et Kouri, 2002 ; Campbell *et al.*, 2003 ; Monath *et al.*, 2001).

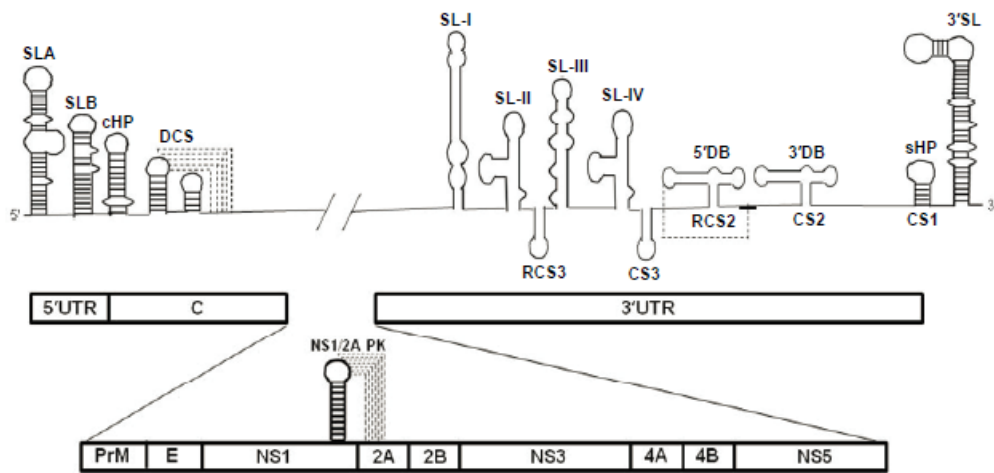


Figure 3. – Représentations schématiques de l'ARN génomique du virus du Nil occidental.

Dans l'ordre, les protéines virales à partir de l'extrémité N-terminale de la polyprotéine : capsid (C), pré-membrane (PrM), enveloppe (E) et protéines non structurales, NS1 à NS5. Les structures en épingle de l'ARN (ou en tige et boucle) conservées (SL) situées dans les régions non traduites 3' et 5', ainsi que la région codante pour la capsid, sont représentées dans la partie supérieure. Les interactions « pseudoknot » sont indiquées par des lignes en pointillés. Les positions des différentes régions codant les protéines virales dans la région ORF (Open Reading Frame) de la polyprotéine sont indiquées dans la partie inférieure. Un « pseudoknot » impliqué dans un décalage de cadre de traduction -1 nécessaire à la production de NS1 est également décrit dans la partie inférieure. Issu de (Brinton 2013)

Diversité génétique

Il existe différents variants en circulation dans le monde et aujourd'hui on compte 9 géotypes distincts, déterminés selon une classification faite à partir des séquences nucléotidiques des gènes codant pour les protéines structurales. La souche américaine provient du lignage 1, au même titre que les souches présentes en Europe et Eurasie. Par comparaison des séquences de des différentes souches, il a été mis en évidence que la souche présente en Amérique du Nord en 1999 avait 99.5% d'identité commune avec la souche israélienne de 1998. Elle-même aurait un

lien avec la souche tunisienne de 1997, dont l'ancêtre proviendrait d'Afrique du Sud ou d'Afrique Centrale (Charrel, Brault et al. 2003, Anez, Grinev et al. 2013).

Avec sa présence sur 5 continents, le lignage 1 a une distribution géographique très vaste et peut se subdiviser en 2 clades : 1a et 1b. Le clade 1a regroupe les souches circulant en Amérique, en Europe, au Moyen-Orient, en Asie, et en Afrique (Charrel, Brault et al. 2003, Monaco, Lelli et al. 2010, May, Davis et al. 2011). Le clade 1b comprend les souches australiennes (Scherret, Poidinger et al. 2001). Le lignage 2 comprend des isolats et des souches africaines et malgaches, ainsi que des isolats émergents en Europe depuis les années 2000 (Papa, Bakonyi et al. 2011). Les lignages 3 à 9 comprennent des souches virales isolées en République Tchèque (lignage 3), en Russie (4), en Inde (5), en Malaisie (6), au Sénégal (7) et en Autriche, Espagne et Hongrie (8-9) (Papa, Bakonyi et al. 2011, Pachler, Lebl et al. 2014)

Le VNO présente non seulement une grande diversité génétique mais aussi géographique sans que la distribution des souches soit corrélée avec la distribution géographique du virus, même si le continent Africain apparaît comme le point d'origine des différentes souches (May, Davis et al. 2011).

Les vecteurs

Espèces vectrices du VNO en Amérique du Nord

Au Canada et en Amérique du Nord, le vecteur préférentiel pour le VNO appartient au genre *Culex* (Rochlin, Faraji et al. 2019). Les différentes espèces varient selon la zone géographique. Par exemple, on trouve *Culex pipiens* et *Culex salinarius* à l'Est de l'Amérique du Nord, *Culex tarsalis* à l'Ouest et *Culex quinquefasciatus* au Sud-Est du continent nord-américain (Metzger, Harbison et al. 2012). Au Québec et au Nord-Est des États-Unis, on trouvera *Culex pipiens* et *Culex restuans*, responsables de plus de 80 % des infections dues au VNO comme cela a été constaté dans l'État de New York (Kilpatrick, Kramer et al. 2005) ou au Québec (Ouhoumane, Lowe et al. 2014).

Les vecteurs *Culex* se nourrissent sur les oiseaux (*Culex pipiens* et *Culex restuans* sont davantage ornithophiles) et sur les mammifères (*Culex salinarius* est davantage mammophile) (Rochlin, Faraji et al. 2019).

D'autres genres, autres que *Culex* peuvent être vecteurs du VNO : *Aedes*, *Anopheles* et *Ochlerotatus* qui elles, se nourrissent principalement sur les mammifères (Apperson, Hassan et al. 2004).

Cycle de vie des vecteurs

Le cycle de vie du moustique se compose de 4 phases distinctes : œuf, larve, nymphe et adulte (figure 4). Seule la phase adulte est aérienne. Les trois premières se passent en milieu aquatique et la ponte des moustiques se fait également dans l'eau. Aussi les plans d'eau stagnante et peu profonde, peu importe s'il s'agit d'un milieu naturel ou artificiel sont des habitats préférentiels pour des espèces comme *Culex pipiens*, *Culex tarsalis* ou *Culex restuans*. (Walton, Schreiber et al. 1990, Reiskind and Wilson 2004).

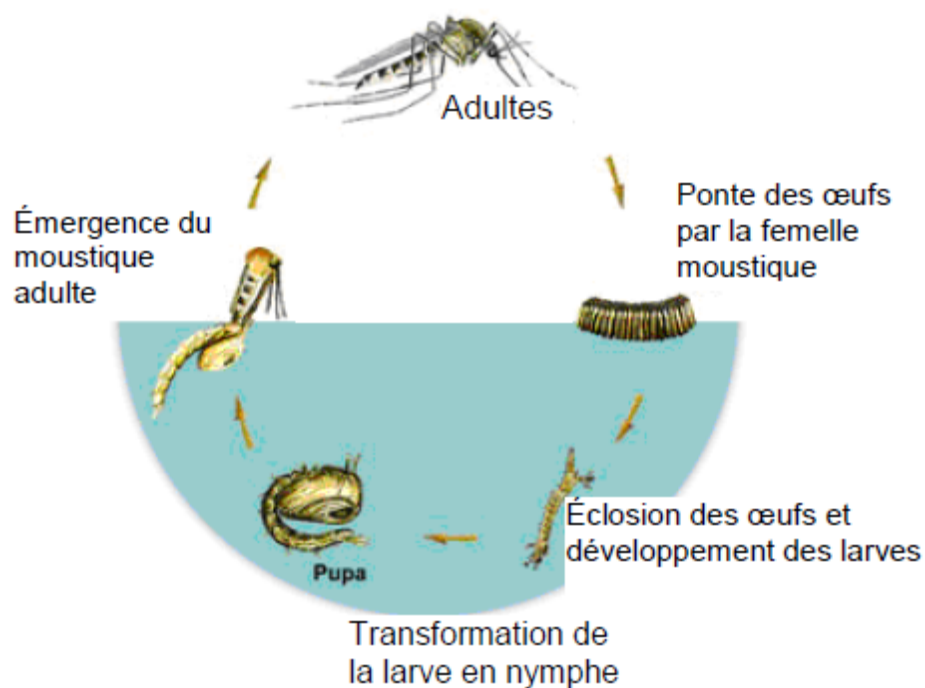


Figure 4. – Cycle de vie du moustique

Issu de (Fortin, Vibien et al. 2013).

Chaque phase du cycle de vie du moustique est dépendant de la température. Des températures plus élevées que la moyenne en début de saison entraînent une diminution de la durée de la phase larvaire et une apparition plus précoce des nymphes et moustiques adultes. La durée de

développement apparait comme inversement proportionnelle à la température (Madder, Surgeoner et al. 1983). En cas d'été chaud avec des conditions optimales, le développement des moustiques est non seulement plus rapide mais la production d'œufs est plus importante et rapide. Le cycle de vie (de l'œuf à l'adulte) de *Culex* dure environ 14 jours (20°C), celui-ci sera d'environ 10 jours en cas de températures favorables (26°C) et peut diminuer et être compris entre 7 et 10 jours durant les mois les plus chaud de l'été (Ruiz, Chaves et al. 2010). La fréquence des repas sanguins augmente alors ainsi le risque d'infection au VNO (Koné 2003).

La période d'activité journalière du moustique est aussi fonction de son espèce. Les vecteurs de genre *Culex* ont leur période maximale de prise de repas sanguin tôt le matin et le soir, ce qui augmente le risque que soit transmis le VNO aux humains pendant ces périodes (Crans 2004, Kilpatrick, Kramer et al. 2005). L'abondance de *Culex* à travers le monde (Bhattacharya, Basu et al. 2016) et son comportement opportuniste et le choix des sites de ponte à proximité des lieux habités, font des *Culex* des vecteurs importants (Crans 2004, Kilpatrick, Kramer et al. 2005, Colpitts, Conway et al. 2012).

Milieu de vie des vecteurs

Les moustiques *Culex* sont très présents dans les régions urbaines, où leur reproduction se fait dans les plans d'eau temporaires et permanents avec végétation, en bordure de rivière, dans des endroits inondés, dans des mares riveraines, des mares de rochers, des aulnaies ainsi que dans différents gîtes artificiels tels que les puisards (Bourassa 2000).

En milieu urbain, une étude réalisée dans les cours arrière des résidences privées de la région de Montréal, a montré que les gîtes ayant les plus fortes densités larvaires, permettant le développement de *Culex*, était des pneus et chaudières, ainsi que des piscines mal entretenues. On trouve également des gîtes dans des barils, des pots de fleurs, des sacs plastiques ou des bassins pour les oiseaux (Boisvert 2005). Une autre étude réalisée à Atlanta, dans l'état de la Georgie, recense également ces différents contenants, dans lesquels de l'eau peut stagner, et

insiste aussi sur l'importance des débordements d'égout et des piscines mal entretenues comme principaux gîtes (Calhoun, Avery et al. 2007).

Du fait, de leur présence dans les régions urbaines, au Québec et au nord-est des États-Unis, *Culex pipiens-restuans* semblent être ainsi les espèces de moustiques les plus impliquées dans la transmission du VNO à l'homme. Cela en fait donc les candidats vecteurs privilégiés pour étudier la circulation du VNO dans une région urbaine de grande densité humaine telle que Montréal.

Transmission du VNO

Le VNO est transmis principalement par la piqûre de moustiques femelles infectés. Elles-mêmes ayant acquis le virus par l'intermédiaire d'hôtes infectés. Après le repas sanguin, le virus se reproduit dans l'intestin et les glandes salivaires du moustique puis se transmet durant les piqûres suivantes par le fluide salivaire auprès d'hôtes naturels tels que les oiseaux (Taylor, Work et al. 1956) ou d'hôtes accidentels tels que les mammifères, qui ne peuvent retransmettre le virus (Hayes, Komar et al. 2005). De façon plus rare, il est possible que le VNO se maintienne dans les populations de moustiques par transmission verticale (de l'adulte aux œufs) (Goddard, Roth et al. 2003, Komar, Langevin et al. 2003).

Une transmission non-virémique a déjà été observée en laboratoire. C'est-à-dire qu'un moustique se nourrissant sur un hôte sain a été infecté par le VNO grâce à la présence à proximité d'un moustique infectant (Higgs, Schneider et al. 2005). Cependant, l'importance de ce phénomène en milieu naturel reste à être déterminé selon la taille de l'hôte et la vitesse de détection de la virémie après un repas infectant (Reisen, Fang et al. 2007).

Une transmission orale du virus entre mammifères et oiseaux, par ingestion de proies infectées a également été observée (Hartemink, Davis et al. 2007, Nemeth, Beckett et al. 2007).

La transmission du VNO peut également se faire de façon non-vectorielle. Chez l'homme, des cas de contamination par transfusion sanguine ont été mises en évidence aux États-Unis et des cas de transmission intra-utérine ou par allaitement ont été suspectés (Hayes, Komar et al. 2005). Chez les oiseaux, des cas de contamination directe : oro-fécale ou par aérosol ont également été

observées en cas de grande proximité des individus (Langevin, Bunning et al. 2001, Komar, Langevin et al. 2003, Jourdain, Toussaint et al. 2007).

Les hôtes

Les oiseaux, hôtes naturels du VNO

En tant qu'hôtes naturels, les oiseaux sont fortement impliqués dans la transmission du VNO. Cette implication varie entre les espèces et s'exprime lorsque l'espèce présente des indices élevés de compétence et capacité d'hôte et peut jouer différents rôles au sein du cycle de transmission : amplificateurs, disperseurs, transporteurs, réservoirs du virus ou sentinelles (Taylor, Work et al. 1956).

Oiseaux : amplificateurs du virus

Les oiseaux sont les amplificateurs naturels du VNO. Ils participent ainsi à la dispersion du virus au sein d'une zone de transmission donnée (Bicout 2013). On considère donc qu'un bon oiseau amplificateur est à la fois attractif pour le moustique et présent en abondance dans une zone donnée (Bicout 2013). En Europe, par exemple, les investigations tendent à considérer le moineau domestique ou la pie bavarde comme de bons amplificateurs, en raison de leur présence locale tout au long de l'année et de leur abondance (Jourdain, Zeller et al. 2008, Balança, Gaidet et al. 2009). En Amérique du Nord, les espèces amplificatrices les plus fréquemment rencontrées semblent être le merle d'Amérique et le moineau domestique (Komar, Langevin et al. 2003, Reisen, Fang et al. 2005)

Oiseaux : disperseurs et transporteurs du virus

Ce sont des oiseaux qui peuvent non seulement véhiculer le virus mais également le conserver pendant une longue période que ce soit dans leur sang (virémiques), dans leur organes (en cas d'infection chronique) ou par le transport de vecteurs (Rappole and Hubálek 2003, Jourdain, Gauthier-Clerc et al. 2007). On peut trouver deux types de transporteurs : les oiseaux migrateurs, qui permettent de transporter et disséminer le virus sur de longues distances et les oiseaux

transporteurs localement, qui vont alors disséminer le virus (Gibbs, Hoffman et al. 2005, Ward, Raim et al. 2006, Nemeth, Oesterle et al. 2009, Bicout 2013).

Oiseaux : réservoirs du virus

En conservant le virus durant une longue période ou en le transmettant de façon non-vectorielle, les oiseaux jouent le rôle de réservoir (Bicout 2013) et assurent ainsi la pérennité du virus en le conservant pendant l'hiver, saison défavorable pour la transmission vectorielle, et permettre sa remise en circulation au printemps suivant (Rodhain 1998). Pour le VNO, on considère que les espèces d'hôtes qui développent une virémie supérieure à 10^6 PFU mL⁻¹, sont qualifiées d'espèces réservoirs (Komar, Langevin et al. 2003, Marm Kilpatrick, Daszak et al. 2006, Wheeler, Barker et al. 2009), ces espèces sont alors capables de conserver le virus plus longtemps au sein de leurs organes par exemple. Ainsi des études réalisées sur l'infection chronique chez différentes espèces d'oiseaux ont démontré que certaines espèces d'oiseaux résidents conservaient le virus au sein de leurs organes (Gamino and Höfle 2013) ou transmettaient le virus par des fientes infectées et pouvaient ainsi constituer des populations réservoirs (Marra, Griffing et al. 2004, Jourdain, Zeller et al. 2008).

Oiseaux : sentinelles du virus

On définit comme sentinelle « un animal choisi dans son milieu ou placé volontairement dans un milieu et suivi au cours du temps afin de détecter précocement, de manière qualitative et quantitative, une exposition à un agent pathogène donné » (Dufour and Hendrickx 2011). Un animal sentinelle, ici l'oiseau, sert d'indicateur biologique, signalant les périodes d'activité du virus avant que la phase d'émergence ne soit atteinte (Rodhain 1998). Par exemple, les oiseaux domestiques tels que les poules ou les canards, ainsi que les oiseaux sauvages, ont été et sont encore aujourd'hui des indicateurs de la présence de grippe aviaire sur un territoire donné (Verhagen, Fouchier et al. 2021). Aux États-Unis, la propagation du VNO a été observée par la grande mortalité des oiseaux (Komar 2001). Ce phénomène a été utilisé très rapidement au sein du système d'alerte prévenant d'une augmentation de l'activité virale (Komar 2001, Mostashari, Kulldorff et al. 2003). Cette surveillance aviaire à l'aide d'espèces sentinelles permet la mise-en-évidence de la circulation du virus et donc des zones et périodes à risque potentiels pour les

populations humaines et équine (Dufour and Hendrickx 2011). Aujourd'hui encore, on se sert des espèces sentinelles et de leur grande sensibilité au VNO afin de définir une zone de circulation active. Cela passe par exemple par l'analyse des carcasses d'oiseaux trouvées, telles que les Corvidés (Julian, Eidson et al. 2002) ou les Strigidés (Smith, Campbell et al. 2018), afin de détecter ou non la présence du virus dans leurs organes effectuées. Ceci est une stratégie employée au Canada par le programme de surveillance passive du CWHC (Canadian Wildlife Health Cooperative).

Repas sanguins des vecteurs

Bien qu'elles soient avant tout ornithophiles, l'analyse des repas de sang des moustiques a confirmé que les espèces du complexe *Culex pipiens* peuvent se nourrir aussi bien chez les oiseaux que chez les mammifères. Se faisant, ces moustiques peuvent donc être un vecteur prépondérant dans la transmission virale en milieu zoonotique, mais également un vecteur passerelle vers les mammifères et les humains (Koné 2005).

Il semblerait également que certaines espèces d'oiseaux soient préférentiellement piquées à cause de facteurs physiologiques, comportementaux ou écologiques qui leur permettent d'être plus attractives que d'autres (Koné 2005). Par exemple, cette préférence peut porter sur la taille de l'oiseau : *Culex tarsalis* et *Culex quinquefasciatus* se nourrissent significativement plus sur des petits oiseaux (respectivement des moineaux et des pinsons) , alors que *Culex erythrothorax* préférera la corneille d'Amérique (Lura, Cummings et al. 2012).

Les mammifères, hôtes accidentels du VNO

Les mammifères présentent une virémie trop faible et de courte durée lors d'une infection au VNO, ce qui implique qu'ils ne peuvent pas intervenir dans la transmission du virus (Koné *et al.*, 2003), on parle alors d'hôtes terminaux ou de cul de sac épidémiologiques. Les chevaux et les humains semblent plus susceptibles de développer une maladie clinique que les autres espèces de mammifères (Root and Bosco-Lauth 2019). Mais même s'il n'y a pas de maladie clinique constatée, le VNO a été détecté chez de nombreux mammifères sauvages et a même été isolé chez des reptiles et amphibiens (Root and Bosco-Lauth 2019).

Des anticorps anti-VNO ont été identifiés chez les opossums de Virginie (Lamglait and Lair 2019), les écureuils (Heinz-Taheny, Andrews et al. 2004), les rats laveurs, les mouffettes (Root, Bentler et al. 2010), au sein de différentes espèces de cervidés (Juřicová and Hubálek 1999, Farajollahi, Gates et al. 2004, Gibbs, Marlenee et al. 2006, Hubálek, Juricová et al. 2017), tels que le cerf de Virginie (Pedersen, Wang et al. 2017) ou le renne, exposé au virus en Alberta (Curry, Ribble et al. 2014). Des cas d'infections chez des ours noirs ont aussi été relevés (Farajollahi, Panella et al. 2003, Bronson, Spiker et al. 2014), et chez les chauves-souris (Kading, Kityo et al. 2018). Chez les éléphants, des cas d'infections d'éléphants d'Asie ont été constatés pour des individus captifs en Zoo (New York et Floride) (Ludwig, Calle et al. 2002, Keller 2005) et des éléphants d'Afrique sauvage ont également présenté des anticorps neutralisants contre le VNO, indiquant ainsi une exposition généralisée dans cette population sauvage (Kading, Borland et al. 2013).

Évolution des cas humains

Évolution des cas humains au Canada

La première flambée épidémique de virus du Nil Occidental en Amérique du Nord date de 1999 à New York, puis le virus s'est ensuite répandu rapidement sur l'ensemble du continent causant la mortalité de plusieurs oiseaux, chevaux et humains (Ciota, Ehrbar et al. 2013). Il a ensuite été détecté pour la première fois en 2002 en Ontario et donc au Canada et y est depuis actif de façon intermittente comme on peut le voir sur la figure 5.

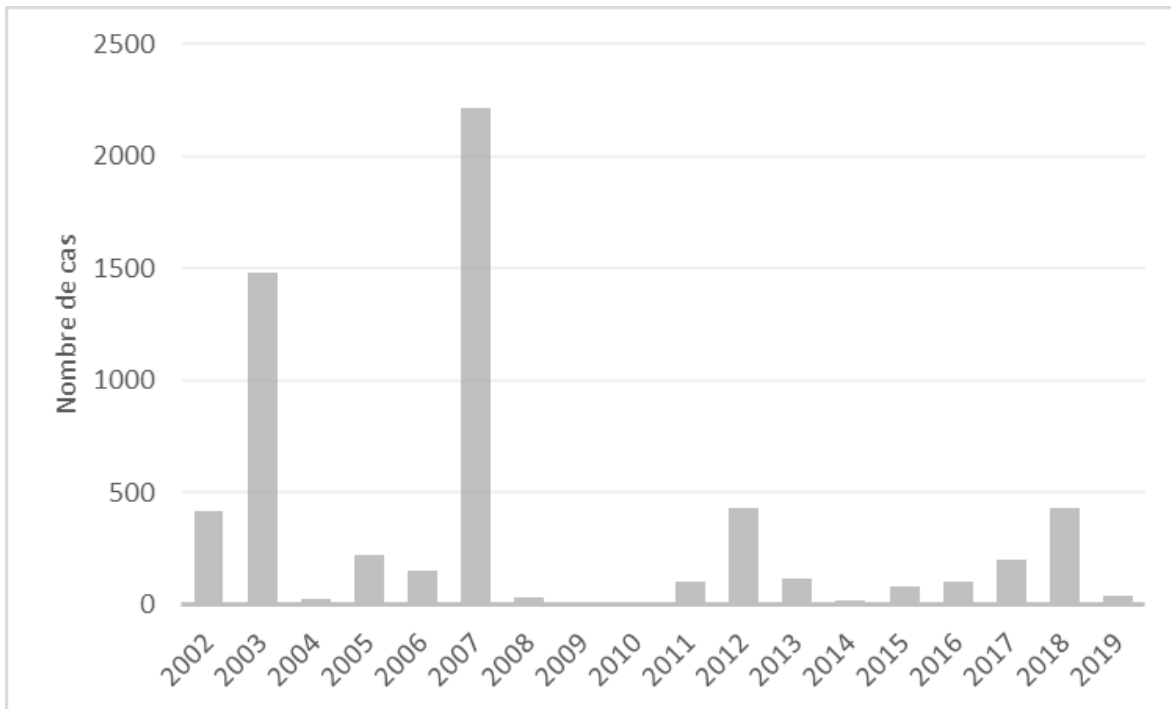


Figure 5. – Evolution du nombre de cas humains au Canada

Données issues de (ASPC 2012-2020)

Au Canada, la présence du virus est principalement localisée dans deux régions séparées géographiquement: la région du centre (provinces du Québec et de l'Ontario) et la région des Prairies (provinces du Manitoba, du Saskatchewan et de l'Alberta), comme on peut l'observer sur les cartes ci-dessous (figure 6). Cela illustre qu'il y a actuellement deux systèmes épidémiologiques de circulation du VNO, impliquant des vecteurs et des hôtes particuliers en fonction de ces régions. De plus, ces deux régions présentent les incidences les plus hautes de cas symptomatiques chez les humains (Chen, Jenkins et al. 2013, Paz 2015). A partir de 2016, on note également l'émergence de cas constatés dans les provinces Maritimes, notamment sur l'île du Prince Edouard (Figure 6)

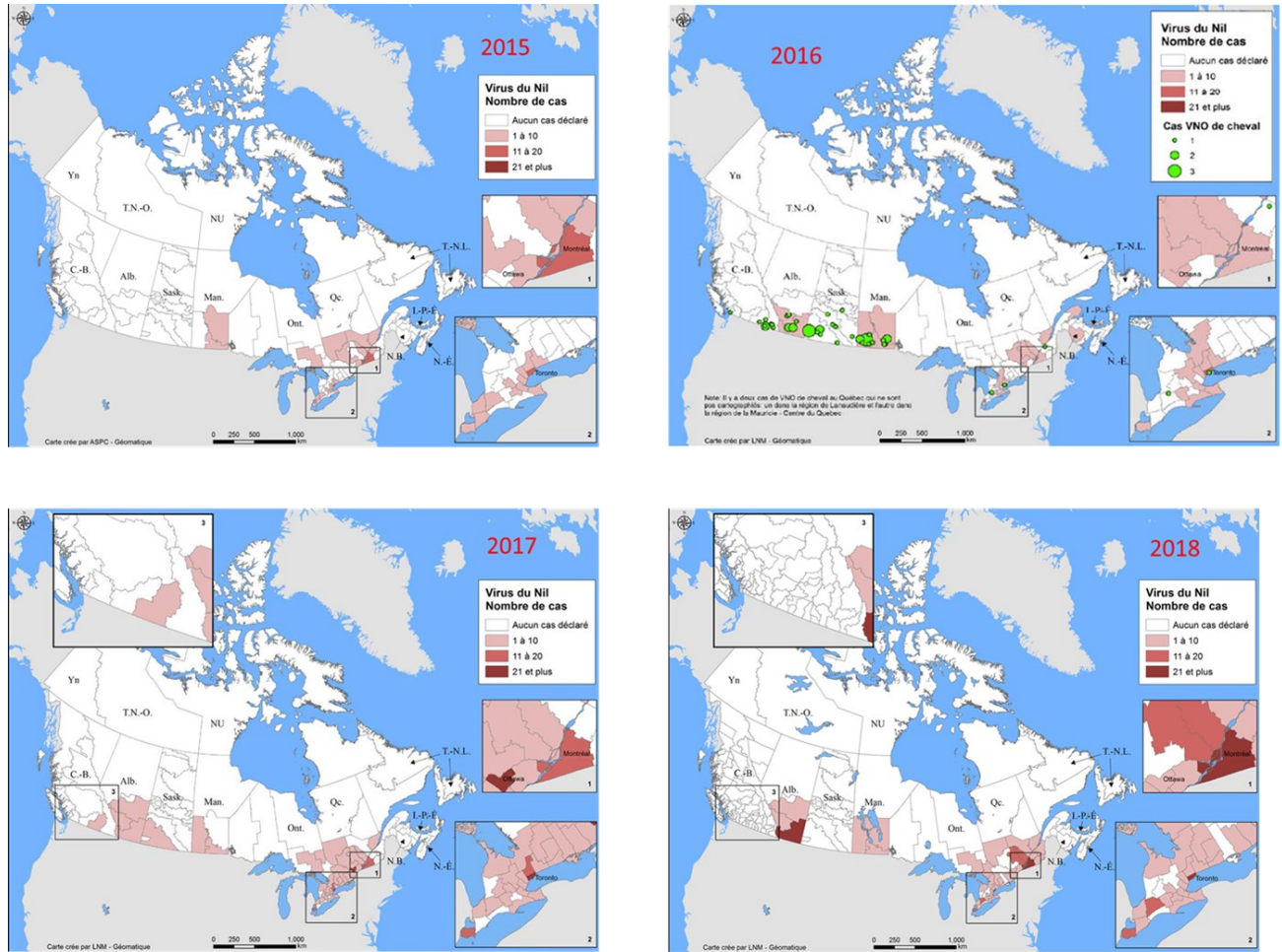


Figure 6. – Cartographie de cas humains du VNO entre 2015 et 2018

Cartes issues de (ASPC 2012-2020)

Évolution des cas humains au Québec

Depuis 2002, année de l'apparition du VNO au Canada, le nombre de cas annuels a beaucoup fluctué au Québec comme le montre la figure 7. Enregistrant des valeurs allant de 1 cas en 2006 et 2007 à 134 en 2012 et 201 en 2018. Ces cas sont principalement répertoriés dans les régions socio-sanitaires de la Montérégie, de Montréal et de Laval (Rocheleau, Michel et al. 2017).

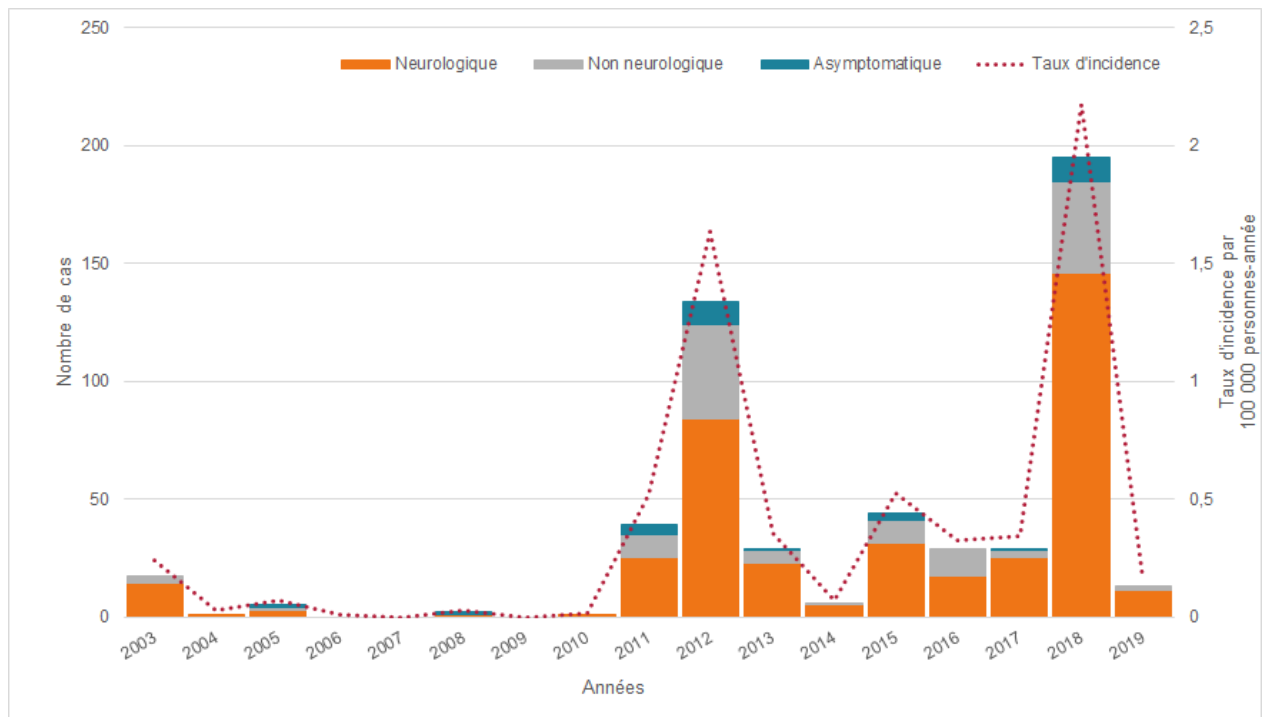


Figure 7. – Nombre de cas humain d’infection par le VNO et taux incidence selon la présentation clinique, Québec, 2003 – 2019

Issu de (Direction de la vigie sanitaire and MSSS 2019)

Mise en parallèle des cas chez les oiseaux et les humains au Québec

Si la proportion de cas positifs diffère en fonction des années (figure 8), on peut observer aussi bien chez les oiseaux que les humains deux vagues épidémiques : la première débute lorsque le virus arrive au Canada en 2002 et tend à se terminer en 2006. La deuxième vague épidémique intervient entre 2011 et 2013.

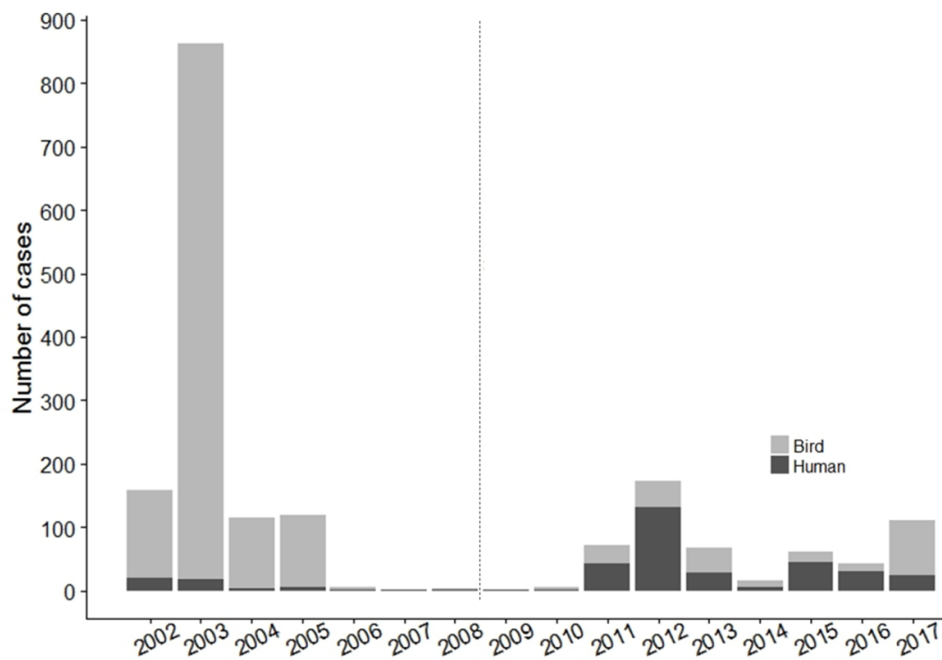


Figure 8. – Évolution des cas humains et oiseaux au Québec entre 2002 et 2017

Données issues des rapports de surveillance de l’ASPC (ASPC 2012-2020) et du CWHC (CWHC 2016)

Chez les oiseaux, les activités de surveillance effectuées sur les carcasses trouvées dans la nature (CWHC 2016) montrent que lors de l’arrivée du virus au Québec, une forte proportion d’oiseaux retrouvés morts étaient positifs au VNO. Les quatre premières années, ce sont plus d’une centaine de carcasses positives qui ont été recensées avec un pic d’environ 850 en 2003. Les années suivantes ne permettent pas d’avoir les chiffres complets des oiseaux morts dans la province à la suite de l’arrêt du programme de surveillance, en raison de la faible activité épidémiologique humaine au Québec entre 2004 à 2010. Cependant lors de la deuxième vague épidémique, on note également une recrudescence du nombre de carcasses positives au VNO, ce qui montre bien que les oiseaux sauvages morts sont devenus des indicateurs quant à la présence du VNO sur le territoire, autrement dit des sentinelles. Au Canada, le Canadian Wildlife Health Cooperative estime que ces données suggèrent que ces cas de mortalité précèdent de deux à six semaines un risque accru de maladie chez les humains (CWHC 2016).

Partie 2 – Analyse des repas sanguins effectués par les moustiques.

L'analyse et l'identification des repas sanguins effectués par les arthropodes hématophages tels que les moustiques permettent d'apporter de nombreuses informations sur les interactions entre les vecteurs et les hôtes et sur la dynamique de transmission des pathogènes (Mukabana, Takken et al. 2002).

Méthodes utilisées

Une étude de repas sanguins s'effectue à partir de moustiques femelles engorgées. Ainsi, la méthode de capture des moustiques nécessite de prendre en compte que l'on a besoin de collecter des moustiques adultes femelles une fois le repas sanguin effectué. Les méthodes d'extraction de l'ADN présent dans chaque échantillon sanguin et l'identification sont ensuite présentées. Et enfin, afin d'établir les différents paramètres de préférence alimentaire relativement à l'abondance des espèces, les méthodes de recensement des espèces sont proposées.

Méthodes de collecte des moustiques

Comme dit précédemment, afin de collecter des échantillons de repas sanguins, il faut cibler les femelles moustiques gorgés de sang, donc des femelles gravides, c'est-à-dire qu'elles sont en recherche d'un site de ponte. En effet, les moustiques femelles, qui sont les vecteurs de la maladie, ont besoin d'un repas de sang pour fournir suffisamment d'éléments nutritifs pour la production d'œufs. En cela les pièges dits gravides sont tout indiqués (Ryelandt, Noireau et al. 2011).

Les pièges à moustiques basés sur la chaleur et les odeurs sont utilisés pour de nombreuses espèces. Ils sont donc attirés par la chaleur et les odeurs produites par les humains ou les animaux, car ils sont capables de détecter des odeurs telles que le dioxyde de carbone (CO₂), l'acide lactique ou l'octenol (Spitzen, Smallegange et al. 2008). Cependant, les performances des

pièges à moustiques sont affectées par leur disposition et leur conception ou tout simplement par le type de moustiques ciblés (larve ou adulte ? type d'espèce ?).

Dans le paragraphe suivant, voici différents types de pièges utilisés dans le cadre d'une collecte de moustique femelle dans le but d'étudier les repas sanguins.

Créés dans les années 60, les CDC light traps sont actuellement les pièges de collectes de moustique les plus couramment utilisés (Newhouse, Chamberlain et al. 1966, Amos and Cardé 2020). Comme leur nom l'indique, ils utilisent la lumière comme attractif, mais peuvent être associés à un deuxième attractif tel que le CO₂ dégagé par la glace sèche afin d'augmenter le nombre de moustiques capturés (Sriwichai, Karl et al. 2015). Développés par le Center for Disease Control (CDC), ce sont des pièges facilement manipulables et transportables. Ils sont alimentés par une batterie, comprennent un ventilateur motorisé, un flux de CO₂ associé à des appâts lumineux. Le flux de CO₂ attire les moustiques adultes en quête d'un repas de sang en mimant le CO₂ relargué par les animaux lors de leur respiration. Les moustiques ainsi attirés sont ensuite piégés dans le filet de collecte, poussés par le ventilateur en action. Ces pièges sont généralement utilisés au crépuscule et collectés après l'aube le lendemain. Il s'agit des pièges les plus fréquemment utilisés pour la surveillance du VNO au Québec actuellement (Bolduc, Côté et al. 2006).

Les EVS traps sont conçus pour attirer les moustiques femelles en quête d'hôtes utilisant le CO₂ issu de la glace carbonique comme attractif principal. Il capture les moustiques de plusieurs genres, y compris *Culex*, *Anophèle* ainsi que *Aedes* (Heym, Kampen et al. 2019).

Les pièges à femelles gravides sont conçus pour capturer les moustiques femelles en recherche d'un site de ponte (Miller, Mettelman et al. 2015). Ils servent notamment à capturer les espèces du genre *Culex*, telles que *Culex pipiens* et *Culex tarsalis*, impliquées dans la transmission du virus du Nil occidental, de l'encéphalite de Saint-Louis et des encéphalites équine de l'est et l'ouest (Kesavaraju, Kiyoguchi et al. 2011). L'attraction des pièges à femelles gravides se fait à l'aide d'eau stagnante afin de créer un gîte artificiel de ponte. Ainsi, on peut agrémenter cette eau d'une solution de matière organique odorante à base d'herbe ou de foin le plus souvent afin d'imiter une eau stagnante naturelle, où les moustiques préfèrent pondre leurs œufs, que l'on place sous

un ventilateur alimenté d'une batterie et qui envoie les moustiques attirés par l'eau dans un récipient collecteur (Hamer, Kitron et al. 2009).

Il existe d'autres types de pièges comme le BG-Sentinel (BGS) qui combinent les deux méthodes d'attraction : lumière et odeurs. Le BGS est un piège plutôt adapté pour les moustiques de genre *Aedes* (Maciel-de-Freitas, Eiras et al. 2006) et particulièrement *Aedes albopictus* et *Aedes aegypti*, qui véhiculent les virus responsables notamment de la dengue, du chikungunya, de Zika et de la fièvre jaune. Ce sont des espèces, que l'on retrouve plutôt en milieu urbain et qui utilisent principalement tout ce qui peut faire office de contenant d'eau naturel ou artificiel pour leur reproduction et sont donc difficiles à attraper. Les pièges BGS sont conçus à l'aide d'un entonnoir situé au sommet du piège, qui mène les moustiques à un ventilateur électrique et les attire dans un filet de collecte. Ils peuvent être utilisés avec une variété d'attractifs et leurres attirant les moustiques, par exemple : le CO₂, des glycoprotéine et l'octenol (octen-3-ol), ce qui en fait un outil polyvalent pour la recherche et la surveillance des moustiques (Rizzoli, Bolzoni et al. 2015, Karki, Hamer et al. 2016).

Hormis les pièges à femelles gravides, les méthodes citées précédemment consiste à attirer les femelles en quête d'un hôte pour se nourrir. Aussi, elles ne sont pas nécessairement adaptées à la collecte de femelles déjà engorgées, ce qui réduit les chances d'obtenir un échantillon important de femelles engorgées.

Afin de palier à cela, il est préférable d'utiliser un piège à femelles gravides. Les femelles étant gorgées de sang avant la ponte, mais il est aussi possible d'utiliser une resting box (Garcia-Rejon, Blitvich et al. 2010). Ces boîtes sont placées au sol à un endroit abrité faisant face à l'ouest pour empêcher la lumière du soleil du matin d'entrer. Les moustiques collectés sont retirés des boîtes de repos le lendemain matin grâce à des aspirateurs (Garcia-Rejon, Blitvich et al. 2010). D'autres types d'aspirateurs peuvent être utilisés (Nasci and RS 1981) afin de collecter les moustiques présents dans la végétation (Apperson, Harrison et al. 2002).

Quelle que soit la méthode de collecte, les moustiques sont transportés vivants au laboratoire et euthanasiés au congélateur avant d'être identifiés selon l'espèce, le sexe et l'état d'engorgement à l'aide des caractéristiques morphologiques (Carpenter and LaCasse 1955, Darsie, Ward et al. 2005). Le stockage des femelles engorgées se fait individuellement généralement à -80°C dans des tubes à centrifuger en attendant l'analyse moléculaire (Muñoz, Eritja et al. 2011, Thiemann, Lemenager et al. 2012, Martínez-de la Puente, Soriguer et al. 2020).

Analyses de laboratoire

L'analyse des repas sanguins se fait en laboratoire selon des méthodes moléculaires afin d'extraire l'ADN présent dans l'échantillon sanguin puis de l'identifier et déterminer sur quelle espèce le moustique s'est nourri.

Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN est une étape nécessaire préalable à l'identification de l'origine du repas sanguin. Pour cela, les abdomens des moustiques sont, dans un premier temps, séparés de la tête et du thorax et conservés. Afin d'éviter toute contamination entre les moustiques, chacun est disséqué individuellement, en utilisant des pinces stérilisées. L'ADN génomique est ensuite isolé du contenu sanguin de l'abdomen grâce à un réactif organique utilisé spécialement pour l'isolement de l'ADN génomique du sang total, tel que le DNA-zol BD (Molecular Research Center, Cincinnati, OH) (Molaei and Andreadis 2006) ou par l'utilisation de kits d'extraction tels que DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Manchester, UK) (Brugman, Hernández-Triana et al. 2015) ou le kit Maxwell® 16 LEV System (Promega, Madison, WI) (Martínez-de la Puente, Soriguer et al. 2020).

Identification de l'origine des repas sanguins de moustiques

L'origine des repas sanguins est déterminée à partir des restes de sang présents dans l'abdomen du moustique lors de la capture. Pour identifier l'hôte auquel correspond cet ADN plusieurs techniques peuvent être envisagées, mais également plusieurs régions du génome peuvent être utilisées en fonction de leurs propriétés (Borland and Kading 2021).

L'ADN mitochondrial (ADNmt) est actuellement la séquence privilégiée, avec l'ADN ribosomique, dans les méthodes contemporaines d'identification de l'origine des repas sanguins des moustiques ou des arthropodes de manière générale (Kent 2009, Reeves, Holderman et al. 2016).

A partir de l'ADNmt, plusieurs régions génomiques peuvent être utilisées :

- Sous-unité I du cytochrome c oxydase (COI). Les COI peuvent être utilisés pour identifier l'espèce comme un système de code-barre (Hebert, Ratnasingham et al. 2003). Leur utilisation comme cible moléculaire est d'ailleurs facilitée par son adoption par le Barcode of Life Consortium et par la disponibilité de codes à barres de référence pour 227 000 espèces animales dans Barcode of Life Database (BOLD) selon la mise à jour de 2020, ce qui fait du COI une cible attrayante pour l'identification (Hebert, Cywinska et al. 2003, Ratnasingham and Hebert 2007).
- Cytochrome b (Cyt b). À l'origine utilisé à des fins médico-légales pour définir les espèces, le Cyt b est devenu une des cibles utilisées pour l'identification des repas sanguins (Kocher, Thomas et al. 1989). En effet, l'amplification de Cyt b est associée à la digestion par une enzyme de restriction afin d'identifier les hôtes des repas sanguins de moustiques jusqu'à 60h après l'alimentation (Fornadel and Norris 2008). Par rapport au COI, le Cyt b a une plus grande variabilité malgré une séquence plus courte. Il présente une variation intraspécifique similaire à COI, un taux plus faible de faux positifs et une plus grande valeur prédictive positive (Tobe, Kitchener et al. 2010).
- ADN ribosomal mitochondrial 12S et 16S (ADNr). Les gènes d'ADNr 12S et 16S ont été utilisés pour l'identification d'espèces avec des résultats variables. L'alignement des séquences 12S et 16S est compliqué par la présence d'insertions et/ou de délétions dans les séquences de nombreuses espèces (Hebert, Cywinska et al. 2003, Vences, Thomas et al. 2005). Cela complique donc la comparaison entre différentes espèces (Knowlton and Weigt 1998). L'avantage est que le taux de mutation de 16S est environ trois fois plus faible que celui des gènes codant pour les protéines, y compris COI et Cyt b, et les deux 12S et 16S présentent une extrémité 3' qui est la plupart du temps conservée chez de nombreuses espèces (Simon, Nigro et al. 1996, Knowlton and Weigt 1998).

- Sous-unité I de la NADH déshydrogénase (ND1). Afin de pallier les inconvénients associés aux locus de groupes taxonomiques, des régions d'ADNmt supplémentaires ont été explorées. Le gène ND1 a été estimé avoir une meilleure variabilité de séquence que COI (Saccone, De Giorgi et al. 1999) et a été utilisé avec succès pour les études taxonomiques sur les chauves-souris (Mayer, Dietz et al. 2007), les reptiles (Karin, Freitas et al. 2018) et les amphibiens (Caviedes-Solis and Nieto-Montes de Oca 2018).
- Boucle D. Appartenant à la région non codante de l'ADNmt, la boucle D est incorporée en tant que troisième brin d'ADN d'une longueur d'environ 650 nucléotides (Nicholls and Minczuk 2014). Cet ADN est souvent appelé ADN 7S en raison de ses propriétés de sédimentation, bien qu'il puisse varier considérablement en longueur en fonction du site d'origine des trois 5' dont il provient (Kang, Miyako et al. 1997, Fish, Raule et al. 2004). La boucle D ne couvre qu'une partie de la région non codante, et seules certaines molécules d'ADNmt contiennent la structure (Doda, Wright et al. 1981). La séquence en boucle D contient au moins une région conservée et 2 régions hypervariables qui offrent un potentiel de codes barre (Borland and Kading 2021).

D'autres éléments nucléaires peuvent également être utilisés mais bien moins fréquemment que l'ADN mitochondrial. Par exemple, l'ADN ribosomal nucléaire, le gène nucléaire prépronocéptine (PNOC), l'ADN microsatellite (Borland and Kading 2021).

Ces dernières années, de nouvelles techniques sont apparues pour l'identification de l'origine des repas sanguins consommés par les moustiques. Par exemple, les approches moléculaires telles que les PCR ou réactions en chaîne par polymérase, qui ciblent une multitude de locus mitochondriaux et génomiques, sont considérées comme le « Gold Standard ». Ainsi les tests PCR ont été adaptés pour le COI (Alcaide, Rico et al. 2009, Reeves, Gillett-Kaufman et al. 2018), le Cyt b (Abbasi, Cunio et al. 2009, Garros, Gardès et al. 2011), 12S et 16S (Sawabe, Isawa et al. 2010, Valinsky, Ettinger et al. 2014, Curler, Moulton et al. 2015), la boucle en D (Collini, Albonico et al. 2015) et la PNOC (Murphy, Eizirik et al. 2001, Anaguano, Ponce et al. 2015, Baum, de Castro et al. 2015).

En plus des techniques de PCR, d'autres techniques (non présentées ici) peuvent être utilisées telles que les tests ELISA (Maleki-Ravasan, Oshaghi et al. 2009, Mucci, Júnior et al. 2015, Zhang, Shi et al. 2017), le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) (Soares, Silva et al. 2014), la chimioluminescence (Honig, Carolan et al. 2017) ou la diffusion sur gel d'agarose (Samuel, Thenmozhi et al. 2014).

Les avancées de ces dernières années proposent désormais des techniques plus rapides, sensibles et spécifiques pour la détermination de l'origine des repas sanguins des arthropodes, et ont ainsi pu apporter plus de puissance aux collectes de données, désormais capables de différencier des espèces même étroitement apparentées.

*Modélisation des préférences alimentaires de *Culex pipiens-restuans**

Afin de pouvoir déterminer les paramètres définissant la préférence alimentaire des moustiques, tels que décrits ci-dessous, il est important de mettre les données issues des repas sanguins telles que décrites précédemment en relation avec la présence et l'abondance de ses hôtes.

Recensement des espèces aviaires présentes sur la zone d'étude

Depuis 1975, la base de données ÉPOQ (Étude des populations d'oiseaux du Québec), gérée en partie par le RQO (Regroupement Québec Oiseaux), répertorie les observations quotidiennes des oiseaux du Québec (espèces observées, nombre d'individus, date de l'observation, nom du lieu, coordonnées géographiques, identification des observateurs, notes diverses) (QuébecOiseaux 2020). Il s'agit de la base de données d'observations ornithologique la plus importante en Amérique du Nord (Dunn, Larivée et al. 1996, Dunn, Larivée et al. 2001).

ÉPOQ a servi de modèle à la conception de la plateforme mondiale ebird, une base de données en ligne d'observations d'oiseaux, élaborée par le Cornell Lab of Ornithology et la National Audubon Society, en 2002, et fournissant aux scientifiques, chercheurs et naturalistes amateurs des données en temps réel sur la distribution et l'abondance des oiseaux. Depuis 2019, l'intégralité des données ÉPOQ (plus de 10 millions d'observations) ont été intégrées à la plateforme ebird (QuébecOiseaux 2020).

Aujourd'hui en Amérique du Nord, la plateforme ebird, qui s'appuie sur la contribution citoyenne, fait autorité et constitue le meilleur moyen d'obtenir des données de recensement des espèces aviaires dans une région donnée (Sullivan, Wood et al. 2009, Zhang 2020). Les données sont accessibles à tous et la plateforme permet à tout ornithologiste amateur d'alimenter la base de données. Fin 2019, ebird comptait plus de 700 millions d'observations sur plus de 10 000 espèces différentes relevés dans 253 pays à travers le monde (Zhang 2020). Cependant, l'échantillonnage reste biaisé dans le temps et l'espace et dépend d'où les ornithologistes effectueront leurs observations. Ainsi des zones proches d'une plus grande concentration de la population ou facilement accessibles seront davantage échantillonnées. De même, l'échantillonnage sera plus intensif le weekend ou en période de vacances (Zhang 2020).

L'utilisation de ces bases de données permet d'apporter de multiples informations quant à la leur statut migratoire mais surtout dans notre cas, la présence et l'abondance relative des espèces d'oiseaux, nécessaires à la création d'indices de préférences alimentaires.

Calcul des paramètres de préférences alimentaires

Plusieurs indices peuvent être créés pour exprimer la préférence alimentaire des moustiques envers une ou plusieurs espèces.

- L'indice d'alimentation (FI) se définit comme la proportion d'alimentation sur un hôte 1 par rapport à un hôte 2 divisée par la proportion comparative attendue d'alimentation sur ces deux hôtes 1 et 2 (Kay, Boreham et al. 1979).

$$FI = \frac{Ne/Ne'}{Ef/Ef'}$$

où Ne et Ne' sont respectivement les nombres de repas effectués sur les hôtes 1 et 2 et Ef et Ef' sont respectivement la proportion attendue d'aliments sur les hôtes 1 et 2 (Kay, Boreham et al. 1979). Cependant cette méthode n'exprime la préférence alimentaire d'un moustique envers une espèce que relativement à une autre espèce et non envers le reste de la communauté d'hôte. Elle ne reflète donc pas l'abondance des hôtes nécessaire à un bon indicateur.

- La préférence alimentaire de Hassan *et al.* compare le nombre de repas sanguins effectués sur une espèce donnée au nombre total de repas sanguins identifiés et effectués sur les espèces de même classe. Les indices sont calculés à partir des données d'abondance et des données d'abondance corrigées par la biomasse globale et la superficie (Hassan, Cupp et al. 2003). La biomasse totale pour chaque espèce est estimée en multipliant le poids moyen d'un individu adulte de chaque espèce par l'abondance globale estimée. Pour cette méthode, des modèles basés sur la distribution multinomiale impliquant les données corrigées pour la biomasse et la superficie sont utilisés afin d'estimer la significativité des indices globaux d'alimentation (Hassan, Cupp et al. 2003). Cette méthode corrige le problème constaté précédemment sur l'indice d'alimentation en prenant en compte la communauté des hôtes et leur abondance. Cette méthode prend également en compte la biomasse pour corriger leur abondance et la superficie du lieu d'étude. Cependant, biomasse et superficie restent des données modélisées qui approximent toujours plus la préférence alimentaire de Hassan *et al.*
- Méthode dérivée des deux précédentes, l'indice de préférence alimentaire P_i est une méthode plus simple et fréquemment utilisée. Il se calcule de la manière suivante :

$$P_i = f_i / a_i$$

où f_i est la fraction de sang pris par le moustique sur un hôte i et a_i , l'abondance de l'hôte i , défini comme le rapport entre la densité de l'espèce i et la densité totale de la communauté aviaire. Cet indice P_i peut également être apparenté au risque relatif pour une espèce donnée d'être piquée par le moustique (Marm Kilpatrick, Daszak et al. 2006, Rizzoli, Bolzoni et al. 2015).

Ici, on considère alors que si :

- $P_i = 1$: la fraction de repas sanguins sur une espèce i est directement proportionnelle à l'abondance des espèces. « Opportunisme ».
- $P_i < 1$: l'espèce est sous représentée par rapport à son abondance. « Évitement »
- $P_i > 1$: l'espèce est « préférée ».

Les valeurs de f_i sont obtenues à partir des données issues des femelles engorgées. Les valeurs de a_i sont issues des données EPOQ – ebird (Kilpatrick, Kramer et al. 2006, Sullivan, Wood et al. 2009, Obeid and Shull 2013, Kain and Bolker 2019).

- Méthode dérivée de la précédente, le calcul de la préférence trophique conditionnelle sur l'espèce i : $f_{B,i}^a$, selon (Balenghien, Fouque et al. 2011), permet de déterminer la préférence d'hôte ou la probabilité que les vecteurs choisissent de se nourrir sur les hôtes d'espèces « i » dans l'écosystème.

$$f_{B,i}^a = \frac{v_{B,i}^a}{\sum_{i=1}^d v_{B,i}^a} = \frac{\left(\frac{V_{B,i}^a}{N_{B,i}^a} \right)}{\sum_{i=1}^d \left(\frac{V_{B,i}^a}{N_{B,i}^a} \right)} ; N_{B,i}^a = B_i^a \times (W_{B,i})^{3/4}$$

où B_i^a est le nombre apparent des espèces hôtes i et W , la biomasse des espèces hôtes i . V_i représente le nombre de vecteurs identifiés comme ayant pris un ou des repas sanguins sur les espèces hôtes i tel que, $V = \sum_{i=1}^d V_{B,i}$. Cette méthode a pour avantage de faire apparaître la notion de « nombre apparent d'hôtes », c'est-à-dire que par rapport aux méthodes précédentes, on nuance le nombre d'hôtes observés en les estimant par rapport à leur biomasse et donc leur occupation de la zone. Cependant, en raison de la difficulté à définir correctement la biomasse de chacune des espèces, on privilégiera la méthode simplifiée de Rizzoli *et al.*, qui utilise moins d'approximation pour exprimer la préférence alimentaire des moustiques.

Préférences alimentaires de *Culex pipiens-restuans*

État des lieux des préférences alimentaires de *Culex pipiens-restuans* en Amérique du Nord et en Europe.

Que l'on se trouve en Amérique du Nord ou en Europe, *Culex pipiens-restuans* est considéré comme l'une des espèces de moustique la plus ornithophile (Schäfer, Lundström et al. 2004, Gingrich and Williams 2005, Bueno-Marí and Jiménez-Peydró 2011, Brugman, Hernández-Triana et al. 2017).

Globalement les études des repas sanguins effectuées, en Amérique du Nord, à partir de *Culex pipiens-restuans* s'accordent à dire que la préférence va au merle d'Amérique (dans le Maryland et Washington DC en 2004, (Kilpatrick, Kramer et al. 2006) ; à Chicago, (Hamer, Kitron et al. 2009) malgré le fait que cette espèce ne représente que 4,5% de la communauté aviaire dans le nord-est de l'Amérique du Nord (Kilpatrick, Kramer et al. 2006).

Hormis le merle d'Amérique, les préférences alimentaires de *Culex pipiens* vont également vers le Cardinal Rouge à Atlanta (Levine, Mead et al. 2016) et New York (Apperson, Harrison et al. 2002) ; le moineau domestique à Atlanta (Levine, Mead et al. 2016) et Chicago (Hamer, Kitron et al. 2008) ; la tourterelle triste à Atlanta (Levine, Mead et al. 2016) et Chicago (Hamer, Kitron et al. 2008) ; le moqueur polyglotte à New York (Apperson, Harrison et al. 2002) ; ainsi que le roselin familial et le geai bleu à Chicago (Hamer, Kitron et al. 2008).

D'autres espèces semblent sous piqués malgré leur abondance : le quiscale bronzé, le moineau domestique, l'étourneau sansonnet (Hamer, Kitron et al. 2009). Ceci pourrait s'expliquer par des préférences phénotypiques de CPR. En effet, il a été démontré que CPR se nourrit préférentiellement sur des oiseaux au plumage plus clair et aux tarse plus longs (Yan, Gangoso et al. 2017). Il a également été observé que le lieu où se trouve l'oiseau pouvait influencer sur son attraction : les espèces aviaires solitaires perchées, malgré leur plus faible abondance, semblent attirer les moustiques en raison de leur taille ou d'un plus grand contraste de couleur sur l'arrière-plan (Yan, Gangoso et al. 2017).

En Europe, *Culex pipiens* se nourrit sur une large gamme d'hôtes avec 82 espèces aviaires (provenant de 33 familles et 14 ordres différents) répertoriées, parmi lesquelles, on retrouve des Turdidae tels que le merle noir en Espagne, Portugal, République Tchèque, Suisse, Italie, Allemagne et Royaume Uni ; des moineaux domestiques (Passeridae) en Espagne, Portugal, République Tchèque, Suisse, Italie, Allemagne et Royaume Uni ; des Corvidae telle que la pie bavarde en République Tchèque, Suisse, Turquie ou Italie ; des tourterelles Turques (Columbidae) en Espagne, Suisse, Turquie et Italie ou encore, plus surprenant par rapport à ce qu'on voit en Amérique du Nord, des poules en Espagne, au Portugal, en Suisse, Italie, Russie et Royaume Uni (Brugman, Hernández-Triana et al. 2018) Au nord de l'Espagne, 4 espèces d'oiseaux dominantes

ont été enregistrées pour *Culex pipiens* : la mésange charbonnière (35,4%), le merle noir (18,7%), la pie bavarde (18,7%) et le moineau domestique (10,4%). Malgré la disponibilité d'hôtes chiens et humains sur les sites d'échantillonnage, la préférence de *Culex pipiens* est restée en faveur des oiseaux.(González, Prosser et al. 2020).

Concernant les mammifères, sa préférence va principalement vers les humains tel qu'observé dans le nord-est de l'Amérique du Nord et plus précisément dans les états du Maryland et Washington, dans la région de Chicago en Illinois et dans la région d'Atlanta en Georgie (Kilpatrick, Kramer et al. 2006, Hamer, Kitron et al. 2008, Hamer, Kitron et al. 2009, Levine, Mead et al. 2016). Ces régions présentent des variations climatiques et météorologiques similaires à celles du sud du Québec. Une autre étude récente, réalisée au Canada, montre que les sources de repas sanguins effectués sur des mammifères étaient les plus courantes sur les humains (24%), les porcs (21,5%), les écureuils roux américains (13,7%) et les cerfs de Virginie (13,7%) (Shahhosseini, Frederick et al. 2021). En Europe, on a répertorié 17 espèces de mammifères (provenant de 12 familles et 8 ordres différents) sur lesquelles des repas sanguins de *Culex pipiens* ont été fait. Principalement des bovidés, des canidés et des félidés et aucun humain (Brugman, Hernández-Triana et al. 2018). Au Portugal, une étude a identifié du sang humain parmi les échantillons, sans toutefois confirmer l'alimentation sur l'homme (Gomes, Sousa et al. 2013). En Iran, il a été démontré que bien que *Culex pipiens* ait accès à une grande abondance d'oiseaux, l'espèce se nourrit régulièrement de mammifères (humains ou non) en plus des espèces aviaires (Shahhosseini, Friedrich et al. 2018).

Changement des préférences alimentaires de *Culex pipiens-restuans* au cours de la saison et impact possible sur la transmission d'un agent pathogène.

Se nourrir de plusieurs espèces hôtes est un déterminant clé de la capacité des vecteurs à transmettre et diffuser des agents pathogènes (Brugman, Hernández-Triana et al. 2017). Cette hétérogénéité des populations-hôte peut avoir des effets importants sur la transmission et le contrôle d'un agent pathogène. Bien qu'ornithophile, *Culex pipiens-restuans* semble changer ses

préférences alimentaires au cours de la saison. Alors que sa préférence alimentaire va vers les oiseaux au début de la saison (mai-juin), le ratio oiseaux/mammifère diminue entre juillet et septembre et est le plus faible au mois de juillet (Levine, Mead et al. 2016). En Amérique du Nord, il est estimé que l'abondance totale d'oiseaux, dominée par les moineaux domestiques (42 à 67% de l'abondance totale), augmente au cours de la saison à la suite de la reproduction des oiseaux (Kilpatrick, Kramer et al. 2006). Ainsi, le changement de préférence trophique entre oiseaux et l'homme ne serait pas la conséquence de la diminution de l'abondance globale des oiseaux, mais plutôt s'opérerait avec la baisse l'abondance des merles d'Amérique, leur ressource préférée au cours de la saison (Kilpatrick, Kramer et al. 2006, Hamer, Kitron et al. 2009, Shahhosseini, Frederick et al. 2021). En effet, le merle d'Amérique semble être responsable de la majorité des transmissions du VNO aux moustiques (Kilpatrick, Kramer et al. 2006, Owen, Landwerlen et al. 2021) et agit comme un « super-propagateur » de ce virus (Simpson, Hurtado et al. 2012, Levine, Mead et al. 2016, Owen, Landwerlen et al. 2021). Dans d'autres régions, on peut observer non pas un shift entre oiseaux et mammifères, mais entre des espèces d'oiseaux. En effet, il a été montré que les populations de moustiques de la région d'Atlanta, qui s'alimentent principalement sur les merles d'Amérique durant leur période d'activité, ont tendance à changer leur alimentation vers la mi-juillet, au moment où ils sont davantage infectieux, pour un hôte moins compétent tel que le Cardinal Rouge (Levine, Mead et al. 2016). En effet, la transmission du virus du Nil Occidental semble être intensifiée avec l'abondance de merles et diminuée quand d'autres oiseaux sont sélectionnés comme hôtes (Hamer, Kitron et al. 2009). Il a aussi été montré que les corneilles font également parti des hôtes favoris des moustiques, alors que les moineaux domestiques ont été sensiblement évités (Kilpatrick, Kramer et al. 2005). De plus, les différences dans la sélection de l'hôte entre les milieux naturels et résidentiels démontrent l'importance de la disponibilité de l'hôte. Une surexploitation plus forte pour les canards et les merles dans les sites résidentiels que dans les sites naturels indique que la préférence de *Culex pipiens-restuans* est spécifique au milieu (Kilpatrick, Kramer et al. 2005). En Europe, il a plutôt été observé un changement subtil de l'alimentation des humains / mammifères (en juillet et août) au profit des espèces d'oiseaux (en septembre) (Brugman, Hernández-Triana et al. 2018).

Une explication possible de ces changements dans les préférences alimentaires pourrait être la composition des communautés hôtes dans les différentes zones d'étude. Les préférences alimentaires de *Culex pipiens* seraient donc directement influencées par le changement d'abondance des hôtes au cours de l'année (Greenberg, DiMenna et al. 2012, Rizzoli, Bolzoni et al. 2015, Shahhosseini, Friedrich et al. 2018). De plus, le rôle relatif des moustiques *Culex* en tant que vecteurs enzootiques et amplificateur de l'infection au VNO parmi les populations d'oiseaux locales dans le nord-est des États-Unis, suggèrent que cette espèce de moustique pourrait servir de vecteur-pont en transférant le VNO d'oiseaux virémiques à des hôtes mammifères (Molaei, Andreadis et al. 2006, Shahhosseini, Frederick et al. 2021). Ce rôle de vecteur-pont donné à *Culex pipiens* a également été mis en évidence en Europe (Börstler, Jöst et al. 2016, Tomazatos, Jansen et al. 2019). Si les moustiques se nourrissent principalement d'oiseaux en été et se déplacent vers l'homme à l'automne, cela peut amplifier à la fois l'intensité de l'épidémie estivale chez les moustiques et les oiseaux et plus tard la transmission du VNO aux humains (Kilpatrick, Kramer et al. 2006, Hamer, Kitron et al. 2009). Cependant, il faut également prendre en compte le fait que la préférence de l'hôte peut être influencée par plusieurs facteurs, tels que les systèmes sensoriels, les récepteurs olfactifs, la disponibilité de l'hôte (Wolff and Riffell 2018). Ainsi, la préférence d'hôte est caractérisée comme une plasticité comportementale, dans laquelle même les moustiques spécialistes peuvent changer d'hôtes en fonction de différents facteurs déterminants (Thiemann, Wheeler et al. 2011, Wolff and Riffell 2018).

Partie 3 – Mortalité et séroprévalence du virus du Nil occidental dans l'avifaune en Amérique du Nord.

Évolution de la mortalité des oiseaux en Amérique du Nord

Lorsque le virus est arrivé en Amérique du Nord en 1999, il a causé une mortalité importante parmi les populations d'oiseaux (Mostashari, Kulldorff et al. 2003). La présence du VNO sur le territoire a ainsi été établie à partir des oiseaux sauvages morts (Komar, Panella et al. 2001). Nous l'avons vu précédemment, l'oiseau peut alors être considéré comme une sentinelle, et signale ainsi les périodes d'activité du virus avant que la phase d'émergence ne soit atteinte (Rodhain 1998). Par conséquent, la surveillance des corvidés morts, notamment les corneilles d'Amérique et les geais bleus, mais aussi d'autres espèces aviaires, peut indiquer que le virus du Nil occidental est actif dans la région. Ce travail de surveillance dit « passif » est coordonné au Canada par le Canadian Wildlife Health Cooperative (CWHC) et aux États-Unis par le Center for Disease Control (CDC). Il est réalisé en collaboration avec le public, invité à signaler aux autorités compétentes toute la faune retrouvée morte dans le but de réduire le risque d'infection chez l'homme (Drebot, Lindsay et al. 2003).

Comme observé précédemment sur la figure 8, qui montre les variations de cas positifs entre 2002 et 2017, la proportion de cas positifs retrouvée chez les oiseaux morts diffère en fonction des années. On peut observer deux vagues épidémiques : la première débute lorsque le virus arrive au Canada en 2002 et tend à se terminer en 2006. La deuxième vague épidémique intervient entre 2011 et 2017.

Selon les données de surveillance du VNO compilées par le CWHC et l'étude des oiseaux morts répertoriés, les espèces impactées par le VNO au Québec sont variables en diversité et en nombre. Alors que jusqu'à 2005, les espèces testées positives au VNO sont presque exclusivement la Corneille d'Amérique (American Crow) et le Geai Bleu (Blue Jay), tous deux des corvidés, il apparaît de nouvelles espèces à partir de 2010-2011. La proportion de Corneilles d'Amérique positives diminue fortement au profit de nouvelles espèces comme le Quiscale

bronzé (Common Grackle), qui appartient également à l'ordre des Passeriformes, ou l'Épervier brun (Sharp-shinned Hawk) de l'ordre des Accipitriformes (CWHC 2016).

Sensibilité des espèces aviaires face au VNO

En Amérique du Nord, la diminution du taux de survie lié au VNO a été observé chez un grand nombre d'espèces. Selon la littérature, on estime cette proportion entre 35 et 47% (LaDeau, Kilpatrick et al. 2007, George, Harrigan et al. 2015). Ceci s'explique notamment par le caractère immunologiquement naïf des oiseaux lors de l'arrivée du virus en 1999 (Komar, Panella et al. 2001). Dans les régions sud du Québec et de l'Ontario, la corneille d'Amérique est, depuis l'arrivée du virus en 2002, l'espèce la plus affectée par le VNO (Ludwig, Bigras-Poulin et al. 2009, Dessureault 2014, Thomas-Bachli, Pearl et al. 2015). À l'échelle du continent, les espèces suivantes ont été trouvées comme affectées négativement par le VNO : la corneille d'Amérique (LaDeau, Calder et al. 2011, Foss, Padgett et al. 2015), la pie à bec jaune, le Geai buissonnier, le roselin familier, le moineau domestique (Foss, Padgett et al. 2015, Kilpatrick and Wheeler 2019), le geai bleu (LaDeau, Kilpatrick et al. 2007, Wheeler, Barker et al. 2009), la mésange à tête noire, le merle d'Amérique et troglodyte domestique, la mésange bicolore (LaDeau, Kilpatrick et al. 2007), le pic mineur, le moqueur chat, le cardinal rouge, le Tohi à flancs roux et le bruant chanteur (George, Harrigan et al. 2015). Les rapaces également sont considérés comme sensibles : principalement les buses à queue rousse et les hiboux grand-duc d'Amérique (Saito, Sileo et al. 2007). Au Québec, sur 20 oiseaux sauvages trouvés positifs en 2020, 30% étaient des faucons émerillon (*Falco columbarius*), 25% des éperviers de Cooper (*Accipiter cooperii*) et 15% des petites buses (*Buteo platypterus*). D'autres espèces appartenaient aux Accipitridae : autour des palombes (*Accipiter gentilis*), buse à épaulette (*Buteo lineatus*), buse à queue rousse (*Buteo jamaicensis*), épervier brun (*Accipiter striatus*) ou encore Pygargue à tête blanche (*Haliaeetus leucocephalus*) et aux Corvidae avec la Corneille d'Amérique ont été relevé avec l'observation d'un individu positif pour ces espèces (Gagnon, Fairbrother et al. 2021).

Selon les espèces, l'impact peut être différent. Par exemple, il a été mis en évidence que certaines espèces, comme le Bruant des champs, le pic mineur et le viréo aux yeux rouges, ont connu des baisses significatives de leur survie associée consécutivement à l'arrivée du VNO. Leurs taux de survie sont ensuite revenus à la normale. D'autres espèces, comme la Grive à dos olive, le Roselin

pourpré et la Mésange bicolore ont vu, eux aussi, leur taux de survie diminuer à l'arrivée du VNO aux États Unis, cependant ces taux sont toujours restés inférieurs à la normale par la suite (George, Harrigan et al. 2015). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces changements dans le taux de survie des espèces face au VNO et les changements d'espèces sensibles au VNO (Corvidés avant 2008 et Corvidés, Accipitridés, Strigidés après 2008). On l'a dit précédemment, le caractère immunologiquement naïf de ces espèces a joué un grand rôle dans leur mortalité importante (Komar, Panella et al. 2001) mais un retour à la normale peut s'expliquer notamment par une protection immunologique observée à long terme (Nemeth, Kratz et al. 2008, Nemeth, Oesterle et al. 2009) ou par une transmission de cette protection aux oisillons (Gibbs, Hoffman et al. 2005, Baitchman, Tlusty et al. 2007).

Chez les oiseaux, comme chez les humains, les symptômes diffèrent d'un individu à l'autre ou d'une espèce à l'autre. Cela va de signes cliniques non spécifiques à la mort subite, en passant par des signes neurologiques sévères (Vidaña, Busquets et al. 2020). L'état général de l'oiseau peut montrer une faiblesse globale et un comportement apathique, ainsi qu'une perte de masse importante (Marra, Griffing et al. 2004). Au niveau des signes cliniques, les symptômes peuvent différer d'une espèce à l'autre. Par exemple, des infections expérimentales ont montré que les strigidés développent plus facilement des signes neurologiques que les autres rapaces et parmi les strigidés, le grand-duc d'Amérique (*Bubo virginianus*) et la Harfang des Neiges (*Bubo scandiacus*) semblent les plus sensibles (Gancz, Barker et al. 2004). Les signes cliniques apparaissent à la suite de l'invasion virale du système nerveux central de l'individu et/ou d'autres organes tels que le cœur, la rate, le foie ou les reins (Steele, Linn et al. 2000) et peuvent se traduire par des tremblements, une désorientation, un port de tête anormal, des convulsions, une perte d'équilibre (Marra, Griffing et al. 2004). Des lésions peuvent également apparaître aux yeux tel qu'il a été observé chez les rapaces (Smith, Campbell et al. 2018) ou d'autres types de lésions concomitantes à d'autres infections virales ou non avec celle du VNO (Joyner, Kelly et al. 2006, Saito, Sileo et al. 2007).

Modes de transmission de l'infection chez les oiseaux

Les oiseaux infectés, ont la capacité de retransmettre le virus à un vecteur moustique lors d'un repas sanguin et sont donc importants pour l'épidémiologie du VNO. Tel qu'indiqué

précédemment, le VNO se transmet principalement aux oiseaux par la piqûre de moustiques femelles infectés en passant par le fluide salivaire (Taylor, Work et al. 1956). Les mécanismes de transmission seront présentés ultérieurement dans la section traitant la compétence vectorielle (partie 4).

Certains oiseaux prédateurs tels que les espèces de la famille des accipitridés et strigidés ou les cathartidae peuvent être infectés par transmission orale à la suite de l'ingestion d'oiseaux malades ou morts et déjà infectés par le virus (Hartemink, Davis et al. 2007, Nemeth, Beckett et al. 2007).

Des cas de contamination directe : oro-fécale ou par aérosol ont également été observés en cas de grande proximité des oiseaux (Langevin, Bunning et al. 2001, Komar, Langevin et al. 2003, Jourdain, Toussaint et al. 2007).

Tests diagnostiques effectués sur les oiseaux

Un des objectifs de la surveillance passive effectuée par le CWHC est de déterminer s'il y a présence ou non du VNO dans une région donnée. Cela se fait par l'étude du niveau de prévalence d'oiseaux infectés à partir d'un nombre suffisant de carcasses d'oiseaux relevées dans la nature.

Pour ce faire, plusieurs tests diagnostiques peuvent être utilisés pour déterminer la présence du virus dans les carcasses d'oiseaux. Ces tests visent à détecter le virus au sein des organes et tissus, notamment sur le rein, le foie, le cœur et le cerveau. Pour cela des nécropsies peuvent être effectuées sur les carcasses avec prélèvement des tissus à l'aide d'un scalpel ou par l'utilisation d'écouvillons (Stone, Okoniewski et al. 2004, Stone, Therrien et al. 2005). Pour un certain nombre d'espèces d'oiseaux différentes, des écouvillons peuvent être prélevés sur les reins, le foie, le cœur, le cloaque, le cerveau et la pulpe des plumes, en plus de la cavité oropharyngée. Des écouvillons de rein et de foie ont été obtenus en collant la pointe de l'applicateur de l'écouvillon dans le parenchyme et en tournant l'écouvillon pour assurer la capture du tissu. Des prélèvements de sang cardiaque sont obtenus en immergeant la pointe dans du sang contenu dans les oreillettes ou le ventricule droit. Des écouvillons cloacaux sont obtenus en déplaçant vigoureusement l'écouvillon contre la muqueuse. Des écouvillons cérébraux sont prélevés en

faisant passer l'écouvillon à travers la matière grise et blanche du cerveau (Stone, Okoniewski et al. 2004, Stone, Therrien et al. 2005).

À partir des échantillons de tissus, on peut effectuer une RT-PCR (Reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction), ainsi qu'une culture cellulaire pour détecter la présence de VNO (Stone, Okoniewski et al. 2004, Panella, Burkhalter et al. 2005, Stone, Therrien et al. 2005). Ces deux méthodes permettent de dupliquer en très grand nombre une séquence d'ADN connue et ce à partir d'un faible échantillon. La RT-PCR utilise au préalable une enzyme, la transcriptase inverse, qui va rétrotranscrire l'ARN et synthétiser l'ADN correspondant. La RT-PCR est bien plus sensible que la culture cellulaire et détecte mieux l'infection car l'ARN est plus stable que le virus présent dans les tissus, ces deux méthodes restent coûteuses en temps et en argent (Shi, Kauffman et al. 2001). Afin de pallier cela, des tests alternatifs ont été mis en avant tels que VecTest (Medical Analysis Systems Camarillo, CA, USA) et le test RAMP (Rapid Analyte Measurement Platform, Response Biomedical Corp, Burnaby, British Columbia, Canada). Il s'agit de deux tests immunochromatographiques, qui utilisent des anticorps marqués pour détecter l'antigène du VNO présent dans les échantillons de tissus (Stone, Therrien et al. 2005). Par rapport à la RT-PCR, VecTest possède de nombreux avantages qui peuvent en faire un substitut utile à la RT-PCR ou à d'autres techniques plus compliquées. Rapide, facile d'utilisation, relativement peu coûteux, il peut être facilement utilisé sur le terrain chez les principales espèces vulnérables au VNO, et peut ainsi être utilisé avec une variété de sources de tissus, avec une efficacité similaire dans les carcasses fraîches et décomposées (Stone, Okoniewski et al. 2004, Burkhalter and Savage 2015).

Séroprévalence

La séroprévalence représente le pourcentage des individus dans une population donnée d'oiseaux par espèce, qui possèdent des anticorps spécifiques au niveau sérique (ou sanguin) contre un pathogène particulier, donc dans ce projet de maîtrise, des oiseaux, ayant été exposé au virus du Nil occidental. Elle est mesurée par détection des anticorps lors de tests sérologiques (Martínez-de la Puente, Ferraguti et al. 2018).

Les oiseaux sont les réservoirs amplificateurs naturels du VNO (Bicout 2013). Les passeriformes (tels que le merle d'Amérique ou la corneille d'Amérique) présentent une virémie élevée (Komar, Langevin et al. 2003, Pérez-Ramírez, Llorente et al. 2014), ceci montre que la transmission du virus à partir de ces espèces est importante. Des études réalisées sur la séroprévalence chez différentes espèces d'oiseaux ont démontré que certaines espèces d'oiseaux résidents constituaient des populations réservoirs (Jourdain, Zeller et al. 2008). Elles peuvent survivre à l'infection et jouer un rôle dans le maintien du virus dans le cycle de transmission oiseaux-moustiques (Komar, Burns et al. 2001). La séroprévalence est déterminée à partir du sang prélevé sur des oiseaux sauvages capturés.

Détermination de la séroprévalence

L'étude de séroprévalence peut se faire en laboratoire à partir des échantillons de sang d'oiseaux sauvages capturés mais peut aussi se faire sur des oiseaux morts collectés lors de la surveillance passive, comme cela a été présenté ci-dessus (Ringia, Blitvich et al. 2004). L'échantillon de sang nécessaire est prélevé par ponction veineuse au niveau de la jugulaire ou de la veine brachéale. Le volume de sang recueilli dépend de la taille de l'oiseau mais ne dépasse généralement pas 0,6 mL (Komar, Panella et al. 2001).

Le test de neutralisation par réduction de plaque (PRNT) est l'un des tests les plus utilisés lors de diagnostics sérologiques du VNO et permet de quantifier le titre d'anticorps neutralisants contre un virus. Pour cela l'échantillon de sérum à tester est dilué et mélangé à une suspension virale. Le tout est ensuite incubé, afin de permettre à l'anticorps de réagir avec le virus, puis réparti sur une culture cellulaire permissive au virus. La concentration du virus en unités formatrices de plages (UFP) peut être estimée par le nombre de plages, c'est-à-dire de régions de cellules infectés (avec ou sans lyses), mesurables par observation à l'œil nu ou au microscopique (selon la dimension des plages), ou suite à une coloration à l'aide d'un marquage avec des anticorps fluorescent antigènes spécifiques ou avec des colorants qui réagissent avec les cellules vivantes (i.e. non-détruites par l'infection virale) (Komar, Burns et al. 2001, Panella, Burkhalter et al. 2005, Dusek, McLean et al. 2009).

Toujours dans la catégorie des tests sérologiques, les tests de type ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) sont également des tests très couramment utilisés en raison de leur rapidité et leur faible coût. Il existe plusieurs types de tests ELISA (Aydin 2015) :

- ELISA direct : un antigène est déposé sur une plaque à puits. Un anticorps spécifique conjugué à un enzyme est ensuite utilisé pour la détection. Si l'anticorps est bien spécifique à l'antigène, une coloration du puit s'opérera.
- ELISA indirect : A la différence de la méthode précédente, l'anticorps conjugué à l'enzyme ne se lie pas directement à l'antigène. Un autre anticorps primaire est lié spécifiquement à l'antigène. L'anticorps conjugué à l'enzyme se lie ensuite à cet anticorps primaire. Il s'agit de la méthode la plus populaire et permet un marquage de plusieurs anticorps à l'anticorps primaire.
- ELISA en sandwich : Cette méthode découle de la précédente, à la différence que l'antigène n'est pas directement au contact du puit mais lié à un premier anticorps dit de capture qui tapisse le puit. Cette méthode se veut plus spécifique en raison de la présence de deux anticorps pour détecter l'antigène.
- ELISA d'inhibition ou ELISA compétitif : Ici l'antigène issu de l'échantillon est en compétition avec un antigène inhibiteur. Cette méthode minimise l'effet de dilution avec la présence de cet antigène inhibiteur et présente une spécificité maximale en raison de la détection et capture spécifique de l'antigène par l'anticorps.

Ces tests restent spécifiques à l'espèce animale testée, en raison du fait que la structure conservée des anticorps et qui est utilisée pour leur détection (c'est à dire la région Fc ou « fragment cristallisable ») et malheureusement unique à chaque espèce animale (Kuno 2003, Maezono, Kobayashi et al. 2021). On peut également être confronté à des réactions croisées entre les différents flavivirus tels que le VNO et le virus de l'encéphalite Japonaise (Kuno 2003, Maezono, Kobayashi et al. 2021). Toutefois, des systèmes de sérodiagnostic de type ELISA d'inhibition sont très sensibles et spécifiques et sont capables de mieux détecter l'infection aviaire par le VNO et ainsi faciliter les enquêtes sur l'épidémiologie du VNO dans la nature (Maezono, Kobayashi et al. 2021).

Variation de la séroprévalence

En Amérique du Nord, on constate que la séroprévalence diffère entre les espèces (Tableau 1). Une étude de 2010 (Dubé, Bird et al. 2010) présentait que la prévalence du VNO (>50%) chez la crécelle d'Amérique (N = 152) dans la région de Montréal était plus haute que celles de la plupart des oiseaux d'Amérique du Nord (Komar, Burns et al. 2001, Komar, Langevin et al. 2003, Ringia, Blitvich et al. 2004). Cette forte prévalence observée chez la crécelle d'Amérique a aussi été mise en évidence en Pennsylvanie (Medica, Clauser et al. 2007).

Tableau 1. – Valeurs minimales et maximales de séroprévalence répertoriées dans la littérature

Species	Seroprevalence (%)	Species	Seroprevalence (%)
	Min (n) – Max (n)		Min (n) – Max (n)
Bernache du Canada	0.8 (1038) - 29 (7)	Grive des bois	1 (101) - 15.6 (32)
Canard branchu	0 (1) - 2.5 (12)	Merle d'Amérique	2.6 (76) - 10.11 (366)
Colvert	8 (13) - 10.6 (66)	Moqueur chat	3.5 (2706) - 35 (17)
Fuligule à collier	5.3 (19)	Moqueur roux	3.7 (643) - 10.5 (19)
Héron vert	100 (1)	Jaseur d'Amérique	20 (5)
Épervier de Cooper	100 (1)	Ovenbird	0.9 (115) - 3.1 (32)
Buse à épaulettes	100 (1)	Paruline masquée	0.7 (299)
Pigeon biset	4.3 (23) - 55 (20)	Paruline flamboyante	0.4 (280)
Tourterelle triste	3.8 (26) - 57.69 (26)	Paruline à collier	4.7 (43)
Coulicou à bec jaune	5.9 (17) - 100 (1)	Bruant familial	3 (59)
Grand-duc d'Amérique	44.4 (9)	Bruant chanteur	0 (13) - 3.4 (88)
Pic chevelu	0 (14) -14.3 (7)	Tohi à flancs roux	0.7 (144) - 9.6 (197)
Grand Pic	20 (5)	Piranga écarlate	2.8 (71)
Crécerelle d'Amérique	16 (152) - 100 (1)	Cardinal rouge	6.2 (503) - 52.2 (115)
Faucon émerillon	100 (1)	Cardinal à poitrine rose	1 (98) - 5 (22)
Tyran huppé	2 (50)	Passerin indigo	3.6 (28) - 2.2 (223)
Geai bleu	0.8 (121) - 35.8 (134)	Sturnelle des prés	100 (1)
Corneille d'Amérique	3.2 (157) - 68.3 (183)	Oriole de Baltimore	8.3 (12)
Hirondelle bicolor	2.6 (156)	Carouge à épaulettes	0 (63) - 10.5 (67)
Mésange à tête noire	0 (107)	Vacher à tête brune	1.8 (494) - 12.5 (24)
Sittelle à poitrine blanche	0 (40) - 2.9 (35)	Quiscale bronzé	0 (106) - 15.4 (13)
Trogodyte familial	5.9 (17)	Roselin familial	2 (927) - 100 (5)
Merlebleu de l'Est	2.4 (126)	Chardonneret jaune	0.3 (337) - 3.1 (128)
Grive à dos olive	2.13 (47) - 3.1 (32)	Moineau domestique	1.6 (1042) - 51 (107)

Les espèces sont classées par ordre et par famille. Les valeurs Min et Max correspondent aux valeurs les plus faibles et les plus élevées trouvées dans la littérature. Le nombre entre

parenthèse associé exprime la taille de l'échantillon sur lequel les prévalences minimales et maximales ont été calculées.

Données issues de (Komar, Panella et al. 2001, Ringia, Blitvich et al. 2004, Godsey, Blackmore et al. 2005, Komar, Panella et al. 2005, Gibbs, Allison et al. 2006, Dusek, McLean et al. 2009, Loss, Hamer et al. 2009, Dubé, Bird et al. 2010, Chuang, Knepper et al. 2011, Kilpatrick, Peters et al. 2013, Komar, Panella et al. 2013, Randall, Blitvich et al. 2013).

La séroprévalence diffère également au sein d'une même espèce, selon les régions ou les années. Ainsi, la corneille d'Amérique présentait une prévalence de 68% (N = 183) avec des variations annuelles de l'ordre de 52.9%-60,5% entre 2003 (N = 17) et 2005 (N = 38) dans le Michigan et atteignait même les 90.6% (N = 53) dans cette même région en 2006 (Gibbs, Allison et al. 2006, Chuang, Knepper et al. 2011). En Géorgie, entre 2002 et 2004, elle n'était que de 9.7% (N = 323) (Gibbs, Allison et al. 2006). De même, la séroprévalence fluctue pour le merle d'Amérique selon les années et les régions d'étude. Par exemple, une étude réalisée sur l'ensemble du couloir migratoire atlantique montre une séroprévalence de 2.6% (N = 76) entre 2001 et 2003. Cette séroprévalence varie de 0% à 20% pour la période automne 2001 (Dusek, McLean et al. 2009). En Géorgie, elle passe de 7,3% (N = 150) en 2002-2004 (Gibbs, Allison et al. 2006) à 15,30% en 2010-2012 (Levine, Mead et al. 2016). En Illinois, elle n'était que de 3,8% (N = 79) en 2002 (Ringia, Blitvich et al. 2004), alors que l'on comptait 17.50 % (N = 160) en 2005 et 4,37% (N = 206) l'année suivante (Loss, Hamer et al. 2009).

Les différences s'observent aussi au cours d'une même année. Ainsi le geai bleu, espèce résidente, présentait en Louisiane, en 2002, une séroprévalence de 25% au mois de juillet, qui diminuait à 9.1% en octobre, ceci pouvant s'expliquer par un changement de préférences alimentaires des moustiques, ou potentiellement par la diminution de l'activité des moustiques, mais aussi en raison de la mortalité du geai bleu attribuable au VNO et ainsi disparaître de la population échantillonnée (Komar, Panella et al. 2005).

Selon le tableau 1, les espèces suivantes présentent des séroprévalences élevées : la corneille d'Amérique, le cardinal rouge, le pigeon biset, la tourterelle triste, le moineau domestique, le geai bleu et le moqueur chat. Ces espèces peuvent être considérées comme des hôtes amplificateurs

importants en raison de niveaux élevés d'exposition, d'abondances modérées à élevées, à condition que leur compétence d'hôte, que l'on aborde dans la partie 4, soit suffisamment élevée, et donc peuvent être considérés comme des espèces cibles utiles dans les programmes de surveillance qui utilisent des oiseaux en liberté comme sentinelles.

Partie 4 – Compétences vectorielles et compétences d’hôte

Les notions de compétences vectorielles et d’hôte permettent de caractériser la faculté que possède un vecteur ou un hôte, respectivement, à transmettre le virus et sert donc d’indicateur sur son implication dans le cycle épidémiologique.

Compétence vectorielle

La compétence vectorielle se définit comme l’aptitude d’un insecte à ingérer un agent pathogène, en assurer la multiplication et/ou le développement et le transmettre en conditions de laboratoire (Rodhain et Perez, 1985). Cet indicateur peut être déterminé expérimentalement en reproduisant le cycle de transmission. Pour cela, le moustique effectue un repas de sang sur un hôte infectieux dans un premier temps. Des tests de transmission sur un second hôte sensible sont ensuite effectués (Bicout 2013). La première expérience de ce type a été effectuée pour *Aedes albopictus* (Philip and Smadel 1943). Les processus de réplication et de dissémination, ayant lieu à la suite de la piqûre sur un animal infectieux, permettent au moustique de devenir infectant. Les interactions vecteur-virus sont importantes dans le concept de compétence vectorielle et sont complexes. La durée associée à cet ensemble de mécanismes est appelée durée d’incubation extrinsèque. Cette durée est variable et peut dépendre de la température mais également de la souche virale et de la dose virale. Cette dernière permet de déterminer le seuil d’infectivité. En effet, en dessous de ce seuil, un vecteur même s’il est compétent ne pourra pas s’infecter (Ebel, Rochlin et al. 2005, Kilpatrick, Fonseca et al. 2010, Bicout 2013, Kramer and Ciota 2015).

Les compétences vectorielles pour le VNO présentent des variations inter-espèces et intra-espèces en raison de leur dépendance à l’environnement (Kilpatrick, Fonseca et al. 2010). Par exemple, on considère que *Culex pipiens* est modérément susceptible dans l’État de New York, au contraire de *Aedes albopictus*, *Aedes atropalpus* et *Aedes japonicus* qui sont hautement susceptibles dans cette région (Turell, O’Guinn et al. 2001). En revanche *Culex restuans* est présenté comme un vecteur efficace en laboratoire (Sardelis, Turell et al. 2001). Une comparaison similaire existe entre *Culex restuans* et *Culex pipiens*, le premier étant plus efficace pour la diffusion et la transmission du VNO (Ebel, Carricaburu et al. 2004, Moudy, Meola et al. 2007). Ceci pourrait suggérer qu’il pourrait y avoir plus d’obstacles à la dissémination et à l’infection des

glandes salivaires chez *Culex pipiens* comparativement à *Culex restuans* (Kilpatrick, Fonseca et al. 2010). Ces variations de compétences vectorielles peuvent également s'expliquer par une adaptation des populations de vecteur, qui apparaît depuis l'arrivée du virus en 1999. En effet, des moustiques hybrides du complexe *Culex* seraient issus du croisement entre *Culex pipiens* (espèce américaine, ornithophile, avec diapause : elle arrête donc son développement, et anautogénie, c'est-à-dire qu'elle a besoin d'un repas particulier pour la ponte d'œufs, ici du sang) et *Culex molestus* (espèce indigène européenne, anthropophage, pas de diapause, autogénie, c'est-à-dire qu'elle a la capacité de pondre des œufs sans pour autant effectuer un repas sanguin). Ce fait a été confirmé par l'étude des marqueurs génétiques (Fonseca, Keyghobadi et al. 2004). Ces hybrides adaptés au climat local favorable à leur développement, auraient donc contribué à la dissémination du virus et à sa survie durant l'hiver.

Réplication

La réplication de l'ARN du virus, telle qu'illustrée à la figure 9, se déroule dans le cytoplasme d'une cellule cible à l'aide du réticulum endoplasmique. Le virus s'attache aux cellules susceptibles de l'espèce hôte, que ce soit un vecteur ou un hôte, telles que les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules endothéliales ou les neurones (Pierson and Diamond 2012). Les virions du VNO, c'est-à-dire les particules infectieuses renfermant le génome viral, pénètrent à l'intérieur de la cellule d'un hôte ou d'un moustique via une endocytose (Brinton 2013). Le virion est ainsi renfermé dans un endosome une fois rentré dans le cytoplasme. En raison du pH du cytoplasme, la capsid se dégrade et libère le génome du virus. Par l'utilisation des mécanismes de réplication de la cellule hôte, l'ARN viral se réplique et il y a synthèse des protéines en plusieurs copies, assemblage de la nucléocapside et libération des virus immatures de la cellule infectée par exocytose (Gollins and Porterfield 1985).

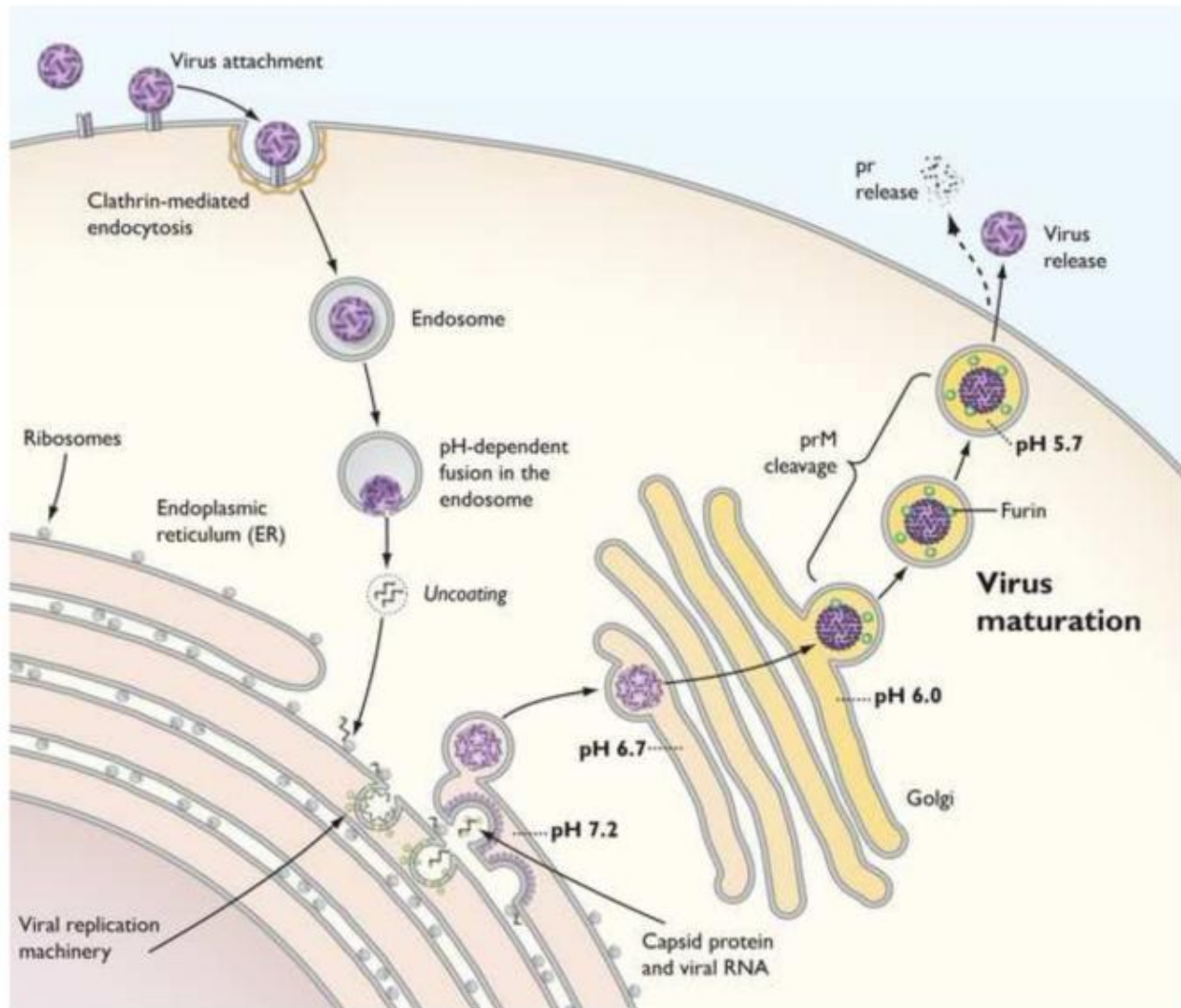


Figure 9. – Schéma de la réplication du VNO dans le cytoplasme d'une cellule hôte de moustique.

Issu de (Pierson and Diamond 2012)

Dissémination

Lors de la dissémination, le virus doit surmonter les barrières intestinales du tractus digestif du moustique (c'est-à-dire l'ensemble des membranes intestinales associées et qui peuvent bloquer la progression du virus lors de la dissémination), ainsi que les barrières salivaires (les éléments qui empêchent le passage vers la salive et donc à la transmission du virus) pendant la période d'incubation extrinsèque en vue d'une transmission ultérieure à un hôte (Hardy, Houk et al. 1983). Ce mécanisme est illustré à la figure 10. L'accumulation de virus dans les glandes salivaires

entraîne une augmentation de la virémie dans la salive et permet au moustique de transmettre le virus aux hôtes sur lesquels il se nourrit (Colpitts, Conway et al. 2012). Lors d'un repas sanguin, le moustique injecte des protéines salivaires pharmacologiquement actives, ainsi qu'au moins un vasodilatateur, un inhibiteur de coagulation et un inhibiteur plaquettaire, et souvent la salive comprend également des protéines immunomodulatrices, digestives et antimicrobiennes (Ribeiro, Charlab et al. 2001, Ribeiro, Arcà et al. 2007).

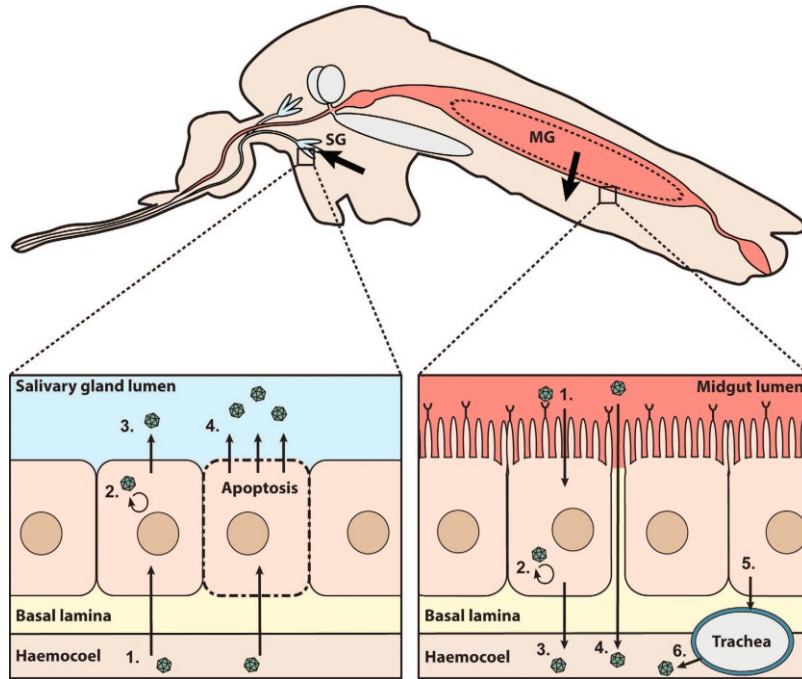


Figure 10. – Vue d'ensemble schématique des barrières intestinales mises en place par le moustique

Tiré de (Vogels, Göertz et al. 2017). Les flèches indiquent le passage des virions à travers les barrières de l'intestin moyen (MG) et des glandes salivaires (SG). Le cercle en pointillé dans l'intestin moyen représente la membrane péritrophique formée après l'ingestion de sang. À droite : 1) Infection des cellules épithéliales de l'intestin moyen via la liaison à un récepteur cellulaire. 2) Réplication du virus dans les cellules épithéliales de l'intestin moyen. 3) Libération du virus par bourgeonnement à partir des cellules épithéliales de l'intestin moyen et passage direct à travers la lame basale de l'hémocoel. 4) Passage direct du virus dans l'hémocoel par un intestin « qui fuit ». 5) Infection virale de la trachée après le bourgeonnement des cellules épithéliales de l'intestin moyen. (6) Bourgeonnement du virus de la trachée vers l'hémocoel. À

gauche : 1) Infection des cellules épithéliales de la glande salivaire après passage dans la lame basale. 2) Réplication du virus dans les cellules des glandes salivaires. 3) Libération du virus dans la lumière des glandes salivaires par bourgeonnement. 4) Libération du virus par les cellules des glandes salivaires dans la lumière des glandes salivaires via la mort cellulaire par apoptose (Vogels, Göertz et al. 2017).

Quantification de la compétence vectorielle

La compétence vectorielle peut être considérée comme l'efficacité de la transmission vectorielle pour une souche virale par une espèce de vecteurs (Bicout 2013).

La compétence vectorielle dépend de deux éléments : les deux types de barrières (intestinale et salivaire) traversées lors de la dissémination et le seuil d'infectivité. Ce seuil est issu de la connaissance de la dose virale et est la valeur minimale pour qu'un vecteur compétent puisse transmettre le virus lors d'une piqûre. Il est déterminé par le taux d'infection, qui détermine également le taux d'infection disséminé par l'effet de la barrière intestinale et le taux de transmission disséminé par l'effet de la barrière salivaire (Turell, O'Guinn et al. 2000). Dans le procédé de détermination de la compétence vectorielle des moustiques pour le virus VNO, la barrière intestinale est très importante (Turell, Dohm et al. 2005).

On peut caractériser la compétence vectorielle CV comme le produit de 3 probabilités :

$$CV = c \times \varphi \times b$$

Ici, c représente la probabilité pour les vecteurs de s'infecter à la suite d'un contact avec le virus lors d'un repas sanguin par exemple, φ est la probabilité que le vecteur nouvellement infecté survive à la durée de l'incubation extrinsèque, et b est la probabilité que le vecteur devenu infectieux ait la capacité de retransmettre le virus ultérieurement (Bicout 2013).

Le tableau 2 présente des données de compétences vectorielles obtenues en laboratoire pour quelques espèces de moustiques en Amérique du Nord. Ces études ont été réalisées pour des paramètres environnementaux similaires à ce que l'on trouve au nord-est de l'Amérique du Nord. Dans chacun des tableaux, le taux d'infection correspond au pourcentage de moustiques contenant des virus dans leur corps. Le taux de dissémination correspond au pourcentage de

moustiques contenant des virus dans leurs pattes. Le taux de transmission estimé correspond au pourcentage de moustiques qui ont développé une infection disséminée. Lorsqu'on multiplie le taux de dissémination obtenu 14 jours après le repas sanguin infectieux par le taux de transmission du vecteur présentant une infection disséminée, on obtient le taux de transmission estimé pour chaque vecteur (Sardelis, Turell et al. 2001).

Tableau 2. – Taux d'infection et de dissémination pour les moustiques oralement exposés au VNO

(Sardelis, Turell et al. 2001, Turell, O'Guinn et al. 2001)

	Souche virale	Dose virale Log10 PFU/mL	Nombres testés	Taux d'infection %	Taux de dissémination %	Taux de transmission estimée %
<i>Cx. nigripalpus</i>	Indian river	4,6	7	29	0	0
	Indian river	5,7	132	78	8	7
	Indian river	6,8	127	84	12	10
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	Sebring	5,5	16	50	6	6
	Sebring	7	78	91	22	20
	Vero Beach	5	13	46	0	0
	Vero Beach	6,3	17	94	12	<13
<i>Cx. restuans</i>	Maryland	6,6	11	100	55	55
<i>Cx. pipiens</i>	Crow 397-99	5,2	46	17	2	2
	Crow 397-99	7,2	95	81	23	20
<i>Cx. salinarius</i>	Chambers	6,6	20	95	60	34
<i>Cq. perturbans</i>	Laurel	6,6	11	18	9	2
<i>Ae. sollicitans</i>	Crow 397-99	5,2	9	11	11	7
	Crow 397-99	7,2	50	70	16	11
<i>Ae. vexans</i>	Crow 397-99	5,2	3	0	0	0
	Crow 397-99	7,2	13	46	8	8
<i>Ae. taeniorhynchus</i>	Crow 397-99	5,2	45	2	0	0
	Crow 397-99	7,2	75	12	3	3
<i>Ae. atropalpus</i>	Crow 397-99	7,2	12	92	92	92
<i>Ae. albopictus</i>	Crow 397-99	7,2	61	90	85	73
<i>Ae. japonicus</i>	Crow 397-99	7,2	36	69	64	64
<i>Ae. aegypti</i>	Crow 397-99	7,2	19	16	16	<16

Le tableau 2 montre qu'avec une dose virale suffisamment élevée, toutes les espèces de moustiques testées sont sensibles à l'infection par le VNO et ont développé des infections

disséminées. En effet, il apparaît que certains vecteurs ont besoin d'une dose virale plus élevée pour développer des infections disséminées, comme constaté chez *Cx nigripalpus*, *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. vexans* ou *Ae. taeniorhynchus* qui présentent 0% de taux de dissémination avec une dose virale de $10^{5.2}$ UFP/mL. Une dose virale plus élevée semble agir comme un amplificateur du taux de dissémination. Concernant le taux de transmission estimé pour chaque vecteur, on constate que *Ae. albopictus*, *Ae. atropalpus* et *Ae. japonicus* sont les vecteurs les plus efficaces (taux de transmission estimé >64%). Dans ces conditions de laboratoire *Culex pipiens* et les espèces *Culex* d'une manière générale sont des vecteurs moyennement efficaces (avec des taux de transmission estimés de 20% pour *Cx pipiens* et situés entre 10% et 55% pour les autres espèces) et ce quelque soit la souche virale et la dose virale testée. En revanche, *Ae. Vexans* et *Ae. Taeniorhynchus* sont des vecteurs inefficaces (puisque le taux de transmission estimé est au mieux <8%), de même que *Cq. perturbans* (taux de transmission estimé <2%).

Facteurs d'influence de la compétence vectorielle

Il a été montré que l'environnement a des effets importants sur la compétence des vecteurs. La température, par exemple, est un facteur important qui peut influencer la compétence vectorielle, qui augmente avec la température (Kenney and Brault 2014).

A contrario, des bactéries telles que *Wolbachia*, qui infectent essentiellement les arthropodes, inhibent la réplication de plusieurs virus à ARN, comme le VNO ou la dengue, chez les moustiques, et limite ainsi la transmission du virus (Hussain, Lu et al. 2013).

Il est également possible, que durant la période d'incubation extrinsèque, une infection au VNO et/ou une concentration virale dans un tissu (abdomen, thorax par exemple) soit corrélée à la présence du virus dans un autre tissu. Cependant, la présence d'ARN viral dans la salive ne montre pas une telle corrélation avec une présence du virus dans d'autres tissus (Richards, Lord et al. 2010).

Capacité vectorielle

La capacité vectorielle se définit comme le niveau d'efficacité d'un vecteur dans la transmission d'un agent pathogène. Elle a été étudiée chez plusieurs espèces de moustiques et dépend des processus de répllication et dissémination et donc de la valeur de la compétence vectorielle (dépendante du taux d'infection disséminé et de l'attraction des femelles pour les oiseaux, qui découle de m dans la formule suivante) (Sardelis, Turell et al. 2001, Turell, Sardelis et al. 2002).

On peut la définir selon l'équation suivante (Kramer and Ciota 2015, Brady, Godfray et al. 2016) :

$$V = \frac{ma^2p^n}{-\ln(p)}$$

Où m est le nombre de moustiques femelles par hôte, a , le taux d'alimentation quotidien en sang, p , la probabilité de survie quotidienne du moustique (équivalent à b dans notre formule de compétence vectorielle), et n , la période d'incubation extrinsèque.

Cette capacité à transmettre le VNO varie selon les espèces. Un moustique avec une compétence élevée peut être un « mauvais » vecteur si la fréquence de contact de l'alimentation sur les hôtes amplificateurs est faible ou si leur durée de vie est faible par rapport à la durée de vie extrinsèque du virus. Inversement, un vecteur peu compétent peut entretenir ou étendre une épidémie si la durée de vie extrinsèque du virus est courte, si l'alimentation est fréquente ou si la densité de population est élevée (Kramer and Ciota 2015).

En Amérique du Nord, certains moustiques sont capables de maintenir activement le virus dans le cycle de transmission entre eux et les oiseaux. *Culex pipiens-restuans* est l'un d'eux. Il s'agit aussi du moustique le plus abondant en milieu urbain. *Culex tarsalis* pourrait être son équivalent en milieu agricole (Goddard, Roth et al. 2002). On trouve également *Culex salinarius*, que l'on retrouve plutôt dans des milieux naturels et qui a la particularité de pouvoir se reproduire aussi bien en eau salée qu'en eau douce (Campbell, Lanciotti et al. 2002). D'autres moustiques ont pour rôle de faire le lien entre le cycle naturel oiseaux-moustique et les mammifères (Turell et al, 2002 ; Goddard et al, 2002). C'est le cas de *Aedes vexans*, *Ochlerotatus canadensis*, *Ochlerotatus dorsalis*, *Ochlerotatus melanimon*, *Ochlerotatus Sierrensis*, *Coquillettidia perturbans* et *Culiseta*

inornata. Ils ne maintiennent pas l'infection. On dira que ce sont des vecteurs passerelles (Turell, Sardelis et al. 2002).

Compétence d'hôte

Le concept de compétence de l'hôte est la capacité d'une espèce hôte, les oiseaux dans ce cas, à s'infecter et à présenter l'agent infectieux à des vecteurs (Komar, Dohm et al. 1999). Il est évalué en exposant des individus naïfs à des moustiques infectés et en suivant la quantité de virus présente dans le sang de ces individus nouvellement infectés au fil du temps. Le nombre de moustiques vecteurs susceptibles d'être infectés sur l'hôte est ensuite estimé en fonction du temps.

Afin d'exprimer ce concept, des indices de compétence de l'hôte ont été développés. Ils estiment la proportion de moustiques infectés après un repas de sang sur des oiseaux porteurs du virus, selon l'expression suivante (Komar, Langevin et al. 2003) :

$$C_i = s_i \times i_i \times d_i$$

C'est-à-dire que pour un hôte i , l'indice de compétence de l'hôte C_i dépend de : s_i , la susceptibilité de l'hôte, soit la proportion d'hôtes qui deviennent infectés après la piqûre d'un vecteur infectant ; de i_i , l'infectivité quotidienne moyenne, soit la proportion de vecteurs exposés qui deviennent infectants chaque jour après un repas sanguin sur un hôte infecté, et d_i , la durée de d'infectivité, soit le nombre de jours durant lesquels un individu oiseaux infecté présente une virémie infectieuse.

La figure 11 présente quelques compétences d'hôtes issues de la littérature. Ces indices issus de la littérature réalisée en Amérique du Nord ne sont valides que pour l'association entre l'espèce d'oiseau et des moustiques du complexe *Culex pipiens-restuans*. Ces indices de compétence de l'hôte, utilisés ici, proviennent exclusivement de la littérature et sont obtenus pour des espèces d'oiseaux infectés expérimentalement avec la souche virale introduite sur le continent américain (Kilpatrick, LaDeau et al. 2007). Lorsqu'une espèce était retrouvée dans deux publications ou plus, la valeur moyenne des compétences d'hôte proposées lui a été alloué.

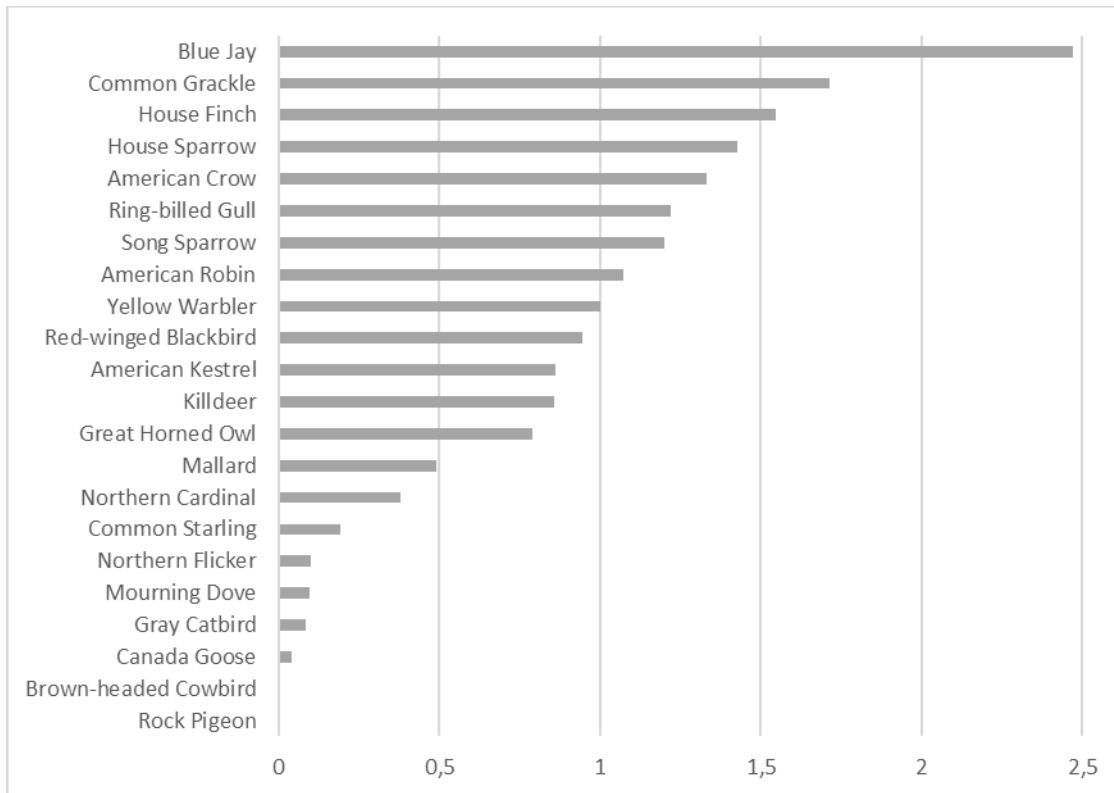


Figure 11. – Compétences d'hôtes associées aux espèces recensées dans les repas sanguins de femelles *Culex pipiens-restuans* engorgées (Komar, Langevin et al. 2003, Kilpatrick, LaDeau et al. 2007, Wheeler, Barker et al. 2009).

Le geai bleu (Blue Jay) présente la plus forte compétence d'hôte (2,47), suivie par le quiscalc bronzé (Common grackle), le roselin familier (House finch), le moineau domestique (House sparrow), la corneille d'Amérique (American crow), le goéland à bec-cerclé (Ring-billed Gull), le bruant chanteur (Song sparrow) et le merle d'Amérique (American robin) qui présentent tous un indice supérieur à 1. À l'inverse le pigeon biset (Rock pigeon) et le vacher à tête brune (Brown-headed cowbird) présentent les indices les plus faibles (0).

Variabilité de la compétence d'hôte

La compétence d'hôte, bien qu'évaluée globalement pour une espèce donnée, est dépendante du vecteur associé. En effet, l'indice de compétence d'hôte vaut pour le couple oiseau-moustique. Cette compétence dépend également de plusieurs paramètres chez les oiseaux tels que l'âge de

l'animal, qui influence également la durée de la virémie. Le statut immunitaire de l'individu joue également sur la variabilité de la compétence d'hôte intra-espèce. L'indice développé correspond à la proportion de moustiques infectés obtenus à la suite d'un repas sanguin sur des oiseaux expérimentalement infectés (Ostfeld and Keesing 2000, van der Meulen, Pensaert et al. 2005).

Selon la définition de la compétence d'hôte, un lien avec la séroprévalence existe. La variabilité constatée de la compétence d'hôte pourrait ainsi expliquer la variabilité temporelle et spatiale de la séroprévalence au VNO qui a été constatée (Hawley and Altizer 2011, Coon, Brace et al. 2014).

Capacité d'hôte

Le concept de capacité d'hôte apporte une nuance à la compétence de l'hôte. Un oiseau compétent ne peut être impliqué dans la transmission du virus que s'il est suffisamment abondant et appartient à l'espèce sur laquelle se nourrit un moustique compétent pour le VNO (Kilpatrick, Kramer et al. 2006, Kilpatrick, LaDeau et al. 2007, Hamer, Kitron et al. 2009, Bicout 2013).

L'indice de capacité hôte est alors défini selon l'expression suivante :

$$F_i = f_i \times P_i \times C_i,$$

où f_i est la proportion de repas sanguins pris sur l'espèce i , P_i est l'indice de préférence de l'hôte (précédemment calculé selon la méthode de (Rizzoli, Bolzoni et al. 2015) et C_i , la compétence de l'hôte issue de la littérature (Hamer, Kitron et al. 2009).

Variabilité de la capacité d'hôte

La capacité d'hôte est variable dans le temps. Elle dépend notamment de la probabilité d'exposition des espèces aux piqûres de moustiques (périodes de la journée ou de l'année pour lesquelles hôtes et vecteurs fréquentent les mêmes biotopes), l'abondance des autres espèces de vertébrés susceptibles de servir d'hôtes aux moustiques (effet dilution) et de l'aptitude des oiseaux à se défendre de la piqûre du moustique (Bicout 2013).

Les préférences écologiques jouent sur la capacité d'hôte : la probabilité de rencontre entre l'hôte et le vecteur dépend de leur présence à un moment et une zone donnée. Ainsi les oiseaux diurnes seront inactifs au moment où les moustiques ornithophiles partiront en quête d'un hôte (Emord and Morris 1984)

La densité et la diversité des oiseaux a aussi un impact sur la capacité d'hôte. Selon la définition de P_i , la préférence alimentaire dépend de l'abondance des hôtes et de leur diversité. Ainsi selon l'équation conduisant à F_i , la capacité d'hôte varie donc dans le temps et l'espace pour une même espèce (Dobson and Foufopoulos 2001, Schmidt and Ostfeld 2001).

Il a également été mis en évidence que le comportement de défense des oiseaux afin d'empêcher le moustique de piquer constituait un autre paramètre impactant la capacité d'hôte (Balenghien, Fouque et al. 2011)

Présentation de l'article

Le bilan de la revue de littérature a souligné que bien que les cas humains et oiseaux fluctuent et que 80% des cas humains sont asymptomatiques, le caractère aléatoire des épidémies font du VNO un risque pour la santé humaine et un enjeu de santé publique.

Il est primordial de mettre l'accent sur le rôle des oiseaux afin d'avoir une meilleure compréhension de la circulation locale du VNO. Un état des lieux sur l'avifaune en Amérique du Nord a permis de montrer que les oiseaux pouvaient être répartis selon différents rôles : amplificateur, réservoir, transporteur, sentinelle, selon leurs caractéristiques d'abondance, de séroprévalence, mortalité, compétence et capacité d'hôte.

Afin d'acquies une meilleure compréhension de ces caractéristiques, on peut non seulement s'appuyer sur des données de littérature, mais également de terrain par l'étude des mortalités aviaires ou l'analyse des repas sanguins effectués par les moustiques afin de déterminer localement parmi quelles espèces aviaires ou non le virus peut potentiellement circuler.

L'article suivant s'appuie sur cette revue de littérature et donne des éléments de réponse sur les espèces d'oiseaux potentiellement impliquées dans le cycle épidémiologique dans notre zone d'étude : la région de Montréal.

Article – Bird Species Involved in West Nile Virus Epidemiological Cycle in Southern Québec

by Ludivine Taieb^{1,2}, Antoinette Ludwig^{1,3,*}, Nick H. Ogden^{1,3}, Robbin L. Lindsay⁴, Mahmood Iranpour⁴, Carl A. Gagnon^{2,5} and Dominique J. Bicout^{6,7,*}

¹ Research Group on Epidemiology of Zoonoses and Public Health (GREZOSP), Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC J2S 2M2, Canada

² Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC J2S 2M2, Canada

³ Public Health Risk Sciences Division, National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada (PHAC), Saint-Hyacinthe, QC J2S 2M2, Canada

⁴ Zoonotic Diseases and Special Pathogens Division, National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada (PHAC), Winnipeg, MB R3E 3R2, Canada

⁵ Swine and Poultry Infectious Diseases Research Center (CRIPA), Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC J2S 2M2, Canada

⁶ Biomathématiques et Épidémiologie, EPSP-TIMC, UMR CNRS 5525, Université Grenoble-Alpes, VetAgro Sup, 38700 La Tronche, France

⁷ Laue-Langevin Institute, Theory Group, 71 Avenue des Martyrs, 38042 Grenoble, France

* Authors to whom correspondence should be addressed.

Int. J. Environ. Res. Public Health **2020**, *17*(12), 4517; <https://doi.org/10.3390/ijerph17124517>

Received: 21 May 2020 / Revised: 18 June 2020 / Accepted: 18 June 2020 / Published: 23 June 2020

Abstract

Despite many studies on West Nile Virus (WNV) in the US, including the reservoir role of bird species and the summer shifts of the *Culex* mosquito, feeding from birds to mammals, there have been few equivalent studies in the neighboring regions of Canada where WNV is endemic. Here, a priority list of bird species likely involved in WNV transmission in the greater Montréal area is constructed by combining three sources of data: (i) from WNV surveillance in wild birds (2002–2015); (ii) blood meal analysis of *Culex pipiens–restuans* (CPR), the primary enzootic vectors of WNV in the region, collected from surveillance in 2008 and 2014; (iii) literature review on the sero-prevalence/host competence of resident birds. Each of these data sources yielded 18, 23 and 53 species, and overall, 67 different bird species were identified as potential WNV amplifiers/reservoirs. Of those identified from CPR blood meals, Common starlings, American robins, Song sparrows and House sparrows ranked the highest and blood meal analysis demonstrated a seasonal shift in feed preference from birds to mammals by CPR. Our study indicates that there are broad similarities in the ecology of WNV between our region and the

northeastern US, although the relative importance of bird species varies somewhat between regions.

Keywords: West Nile; wild birds; *Culex* feeding/host preference; eco-epidemiology; Québec

1. Introduction

First described in Uganda in 1937 [1], West Nile Virus (WNV) is an arbovirus of the *Flaviviridae* virus family, genus *Flavivirus*. It has a transmission cycle involving mosquitoes as vectors and birds as amplifying hosts or reservoirs, with humans and horses being primarily dead-end hosts [2,3]. In humans, the early symptoms of WNV include fever, headache, skin rash, nausea and muscle aches. Most of the affected people recover fully, but approximately 1% develops severe illness (meningitis, encephalitis, acute flaccid paralysis and poliomyelitis) [4]. Those over 70 years of age with underlying medical conditions and those who are immuno-compromised are at a greater risk of severe illness [4]. In North America, the first WNV outbreak occurred in New York in 1999, and WNV spread rapidly across the continent, causing mortality in many bird species [5,6,7]. In less than four years, the virus spread to most of the continental United States, and its activity was first reported in Canada in 2001 [8]. WNV is now endemic in much of southern Canada and, given the potential severity of the disease in humans and the lack of treatment or a specific vaccine, WNV infection is a major public health concern in Canada, including in the province of Québec [9]. Most human cases of WNV reported in Canada occur in Québec, Ontario and the Prairie provinces, and the intensities of the outbreaks of WNV vary temporarily and spatially, as shown in [Figure 12](#). In Québec, human cases of WNV are mainly reported from the Montérégie, Montréal and Laval regions of southern Québec [9]. This study focuses on the Montréal area, one of the regions most affected by WNV in Québec, with 28% of the clinical cases of WNV reported between 2002 and 2014 [9].

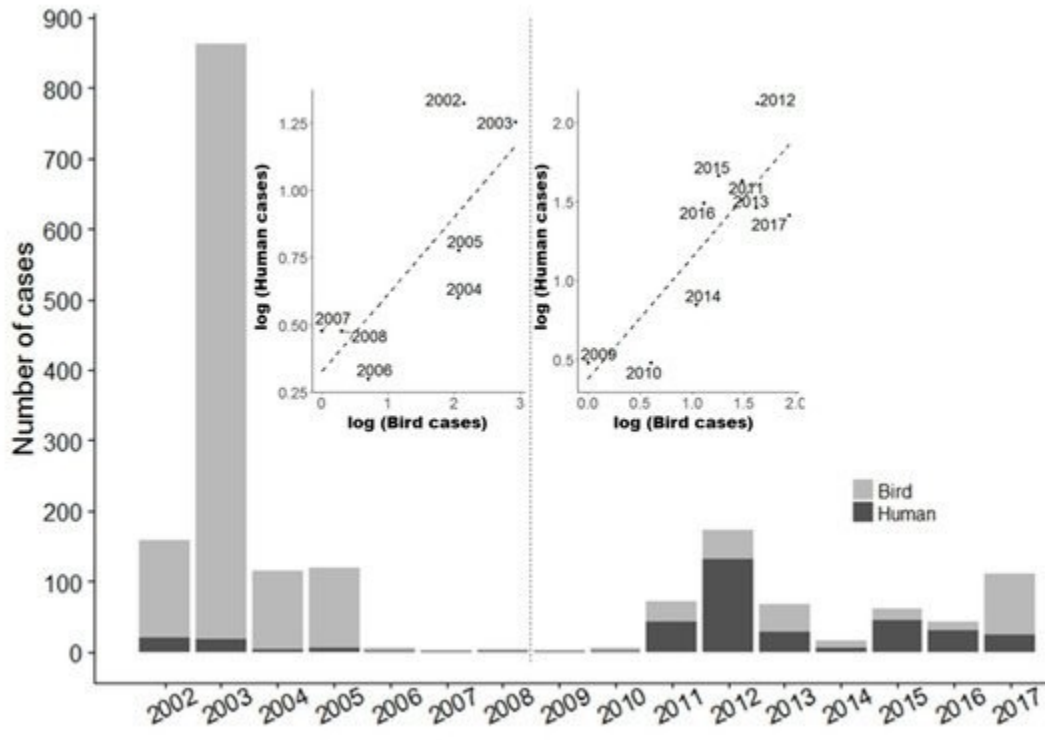


Figure 12. – Yearly number of cases of West Nile virus (WNV) infection in humans and number of dead birds positive to WNV in Québec 2002–2017.

Insert: Correlation between the number of WNV bird and human cases in Québec.

The epizootiological cycle of WNV transmission involves bird of several species that act as reservoirs/amplifying hosts and a range of mosquito species that transmit the virus amongst animals (enzootic vectors) and/or to humans (epizootic vectors). Mammals, such as horses and humans, are incidental or dead-end hosts that are not part of the virus transmission cycle because they do not produce viremia sufficient to infect mosquitoes [10]. In southeastern Canada, including Québec, the main WNV enzootic vectors are *Culex pipiens* and *Culex restuans* [11] and these species are also involved in the transmission of WNV to humans in neighboring parts of the northeastern US [12,13,14].

A range of bird species can act as reservoir hosts for WNV, and annual migration by many species disperses WNV over long distances [15,16,17,18,19]. The importance of birds species as amplifying hosts depends on a combination of factors: (i) the susceptibility to infection; (ii) the duration of viremia at levels high enough to infect feeding mosquitoes; (iii) the density of naïve

individuals (a combination of the density of the species and rates of infection followed by protective immunity); (iv) the “attractiveness” of the species to (ornithophilic and opportunistic) mosquito vectors and thus the proportion of mosquito bites per unit of space–time that occur on the species; and, (v) the rates of mortality, including WNV-specific mortality, of infected individuals.

Experimental studies have shown that several North American bird species are susceptible to WNV and can transmit the virus because they produce a level of viremia that is sufficient to infect mosquitoes that feed upon them—some species die as a result of this infection [20]. Mortality in wild bird populations, particularly corvids, was used as an early surveillance signal of WNV activity in a given locality, as the virus first spread across the US and then Canada [21,22]. Wild bird mortality was also used as an index of the rates of expected human cases of WNV [23]. Retrospective analysis suggested that, when it first invaded North America, WNV caused mortality in a wide range of bird species [24].

Studies in the US have taken into account the multiple factors that define reservoir competence, and by combining field observations and laboratory experiment results, they conclude that the American robin is a key reservoir species [12]. Furthermore, studies from the US suggest that the seasonal nature of human WNV cases (with most cases from late summer through to mid-autumn) is associated with a shift in mosquito blood meals from birds to mammals during the high-risk period, which may be driven by birds beginning their southward migration at this time [13]. To date, similar studies on the transmission dynamics of WNV in Canada are lacking.

In this study, we aimed to develop a priority list of bird species likely involved in the circulation of WNV in the region of Montréal in southern Québec, Canada. To do so we scanned the literature and dead bird surveillance data to identify bird species that breed in the region and are known to be competent WNV amplifiers/reservoirs. We also prioritized these species according to field and laboratory data on the feeding preferences of *Culex pipiens–restuans* (CPR) mosquitoes, while accounting for bird species abundance in the Montréal area. The blood meal analysis data also allowed us to explore the occurrence of seasonal shifts in the host-feeding behavior of key species of vector mosquitoes. Collectively this data allowed us to determine the bird species that are key

amplifier/reservoir hosts for WNV and to determine the extent to which host shifting occurs in vector mosquitoes in Québec.

2. Materials and Methods

2.1. Study Area

The greater Montréal area is located in the southern Québec, as shown in [Figure 13](#), and in the central part of the St. Lawrence Lowlands. The region is bordered to the north by the Canadian Shield and to the southeast by the Appalachians [[25](#)]. The region is characterized by a temperate continental climate, with cold winters and hot summers [[25](#)]. The study area is 30,231.2 km², and includes the island of Montréal and was limited by the coordinates 46°13'48 N, 45°1'12 N and 74°24'36 W and 72°23'24 W. In 2011, the greater Montréal area was comprised of 21% buildings, 40% cultivated agricultural land and 39% natural or semi-natural areas, of which 66% was forest [[26](#)]. With 2,900,000 inhabitants, about 45% of the Québec province's population, the greater Montréal area is the most densely populated area in Québec and the second most densely populated city in Canada.

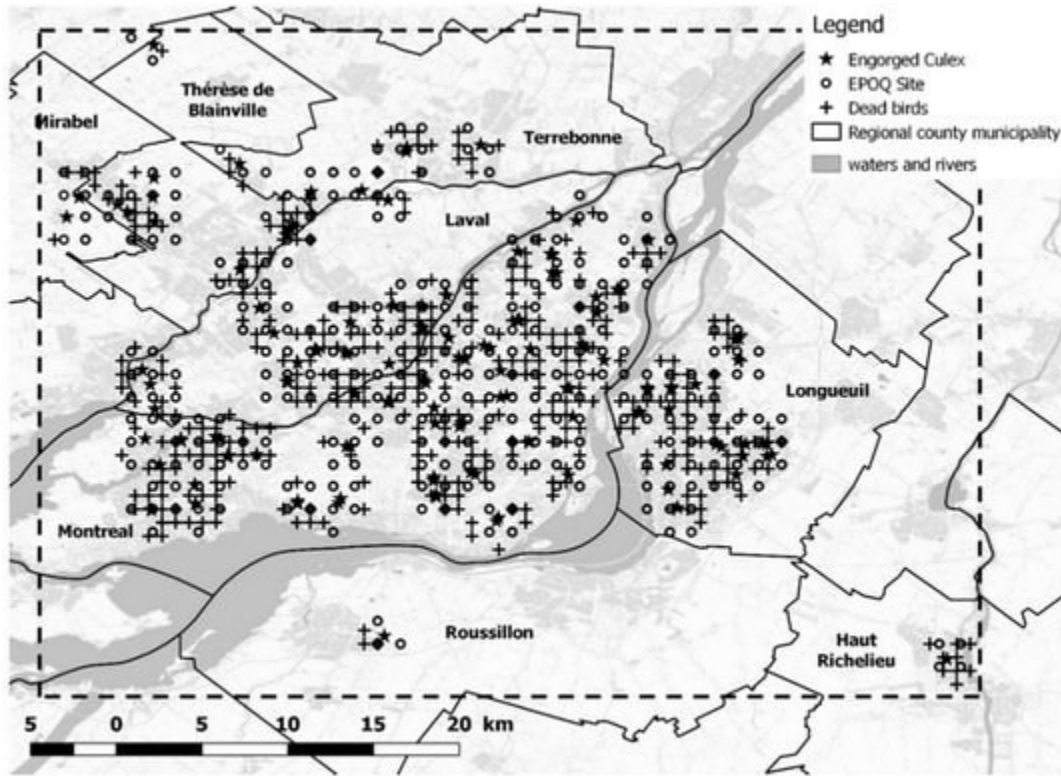


Figure 13. – Study area with locations of collection of dead birds (CWHC), bird watching and counts (EPOQ) and collection of engorged female *Culex pipiens-restuans* on the island of Montréal, Québec.

2.2. Identification of Priority List of Wild Bird Reservoir Species

To construct the list of bird species that are possible WNV amplifier and reservoir host in our study area, we used an approach by successive augmentation. Starting with a reference list of regional breeding bird species L_0 , the priority list L_f of birds that could potentially play a role in the WNV transmission cycle was obtained as, $L_f = L_0 \cup [L_1 + L_2 + L_3 - L_1 \cap L_2 - L_1 \cap L_3 - L_2 \cap L_3 + L_1 \cap L_2 \cap L_3]$, where \cup indicates the “union” of data from databases (bringing all species from the databases together), and \cap indicates the “intersection” of data from the databases (i.e., where species are in the different databases). L_1 , L_2 and L_3 are, respectively, the “databases” of: (i) species identified as infected by WNV in dead bird surveillance; (ii) species identified as being targets for CPR blood meals on the basis of blood meal analyses; (iii) species identified as WNV reservoirs by literature review. In

summary, L1 is the first basic list that is augmented with species from L2 and L3 not already in L1. The comparison with L0 is a check to ensure that selected bird species are found in the study area. L0 comprised 318 species extracted from the Avibase database [27], which includes all breeding species in the Montréal area. Species reported as rare ($n = 65$) in the Avibase were excluded from L0. Details on L1, L2 and L3 are described in the sub-sections below.

2.2.1. Wild Bird Mortality Data: List L1

Wild bird mortality data were obtained from the Canadian Wildlife Health Cooperative (CWHC) Passive Mortality Monitoring Program [28], and data specific to WNV mortality were acquired from the passive WNV wild bird surveillance program, which was established in 2001, the first year that WNV was detected in Canada [29]. This “passive” surveillance work was carried out in collaboration with the local population, which was invited to report dead bird sights to the relevant authorities. Dead birds were retrieved and submitted to veterinary diagnostic laboratories [29]. In these laboratories, necropsies were performed, and selected tissues were tested for WNV [29,30]. The data cover the period 2002–2015, during which time two WNV epidemics occurred in Québec. The locations where dead WNV-infected birds were collected are reported in [Figure 2](#). To rank birds species belonging to L1, the standardized mortality ratio, or relative ratio, RRs, for each bird species “s” was calculated as, $RR_s = m_s / (\lambda \times n_s)$, where m_s is the number of dead birds of species “s” found positive for WNV, n_s is the corresponding sample size and $\lambda = \sum m_s / \sum n_s$, is the mortality rate under the homogeneous hypothesis; $(\lambda \times n_s)$ is the expected number of dead birds of species “s”.

2.2.2. Blood Meal Data: List L2

Mosquitoes were collected in our study region between 2008 and 2014 as part of a provincial mosquito surveillance program conducted in southern Québec [9]. Blood meal analysis was conducted only on engorged females of either the *Culex pipiens* or *Cx. restuans* (CPR) complex in this study. The capture sites of engorged females are shown in [Figure 2](#). The list L2 consists of bird species identified as blood meal sources for CPR complex mosquitoes. Note that females of *Culex pipiens* and *Cx. restuans* cannot be reliably differentiated morphologically, so the specimens were grouped together as CPR complex mosquitoes.

Blood-fed mosquitoes were stored individually in 1.5 mL tubes at -80°C until processing. The extraction of DNA was carried out using a protocol described by Molaei et al. [31]. Briefly, 200 μL of DNAzol[®] BD (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) was added to each tube. The mosquitoes were homogenized with a pestle, followed by the addition of another 200 μL DNAzol BD and 15 μL proteinase-K. The tubes were vortexed briefly, incubated at 70°C for ten minutes, then centrifuged for ten minutes at 14,000 rpm. The supernatants were transferred to new 1.5 mL tubes and 3 μL polyacryl carrier (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) was added to each tube. The tubes were incubated at room temperature for three minutes and then 200 μL 100% ethanol was added. Following mixing by gentle inversion, the tubes were incubated on ice for ten minutes, then centrifuged for six minutes at 6000 rpm. The supernatants were removed, and the remaining DNA pellets were washed twice with the addition of 750 μL 75% ethanol and two minutes of centrifugation at 3000 rpm. After the final removal of the ethanol, the tubes were left open to allow the DNA pellets to air dry. Once dry, the pellets were re-suspended in 20 to 50 μL 1 \times TE buffer. The DNA extracts obtained from blood-fed mosquitoes were used as templates for the amplification of the *cytochrome b* gene in avian and mammalian species using primers previously described by Molaei et al. [31]. The extracted DNA was amplified in 50 μL reactions using the Platinum taq DNA polymerase system (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with final concentrations of 1.5 mM MgCl_2 , 200 nM dNTP and 200 nM per primer. Amplification was carried out in the Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 using the following conditions: denaturation for two minutes at 94°C , 40 cycles of amplification consisting of 30 s at 94°C , 50 s at 55°C (mammalian) or 60°C (avian), 60 s at 72°C , extension for seven minutes at 72°C and then held at 4°C . The first 100 amplification products were visualized by gel electrophoresis on 1.9% agarose gel, whereas the remaining samples were run on QIAxcel (Qiagen, Toronto, TO, Canada). Positive samples were purified using the Wizard SV Gel and PCR Clean-up system (Promega, Madison, WI, USA), and Sanger sequencing was performed by the NML Genomics Core Facility using Applied Biosystems 3730 xl DNA Analyzer with Big Dye Terminator version 3.1 and pop7 chemistries. The sequence data were analyzed using DNASTAR Lasergene 9 software and compared to those in the GenBank (NCBI). Since the technology used does not allow for the accurate identification of mixed blood meals, the sequence data from mosquitoes that took

multiple host blood meals from different species did not lead to identifiable host species. However, we expected that these events would be rare because adult female *CPR* typically complete feeding on a one host.

Identified bird species (see Results section) are characterized by the proportion f_s , defined as the ratio of *CPR* blood meals taken from the species s divided by the *CPR* blood meals from all identified bird species. The value of f_s depends both on the relative density of species s and on the degree to which a species may be particularly attractive to the mosquitoes—if so, then mosquito bites on a particular species may be disproportionate to the density of the species. To explore this, a feeding preference index can be obtained as [32]: $p_s = f_s / a_s$, where f_s is as defined above and a_s is the ratio of the abundance of species s over that of the total density of the birds in the area. Such a p_s can be regarded as the relative risk for a given bird species of being bitten by the mosquito in relation to its relative abundance [32]. Unfortunately, p_s gets larger and tends to infinity when a_s tends to zero. Therefore, we use the following definition for the preference index [33,34]: $p_s = a_s f_s / \sum_{j=1}^n a_j f_j$, where n is the total number of bird species identified from *CPR* blood meals. Likewise, the relative risk for a given bird species of being bitten by the mosquito, relative to homogeneous abundance, is $RR_s = n \times p_s$. Bird species bitten more or less often than chance are characterized by $RR_s > 1$ and $RR_s < 1$, respectively.

Values for a_s were obtained from wild bird count data, taken from the EPOQ-ebird database, managed, in part, by the Regroupement Québec Oiseaux (RQO) for the years 2001 to 2016 [35]. This database contains more than six million observations made by ornithologists during their daily bird watching trips within Québec. These data are obtained from opportunistic sampling—each observer records the species observed, as well as the number of individuals of each species seen. These sets of observations correspond to an observation site at a given date during a given period of time, as well as to the number of individuals of each species observed. Locations at which bird counts were made are shown in [Figure 13](#).

Analysis of Seasonal Bird-to-Mammal Feeding Shift of *CPR* Mosquitoes

Culex mosquitoes are classified as ornithophilic species (i.e., mainly feeding on birds) [13,21,36]. We investigated whether the feeding preferences of the mosquitoes changed over the activity

season. We considered the fraction (or probability π_{bird}) of blood meals taken on bird species (i.e., number of blood meals on all bird species only/total number of blood meals over all species (birds and mammals)) as a function of the week of the year. Logistic regression was used to model the variation of the feeding preferences over weeks as follows: $\text{logit}(\pi_{\text{bird}}) = \beta_0 + \beta_1 \text{week}$. Statistical analyses were performed using the GLM (generalized linear model) function in R, version 1.1.383 [37].

2.2.3. Literature Review: List L3

Literature research was conducted in August 2017 in five electronic databases: Scopus, Pubmed, CAB Abstract, Embase and Medline. The search terms used for searching in all databases were: “(West Nile Fever OR West Nile Virus) AND (Bird* OR Avian) AND (Mortality OR Sero-prevalence OR prevalence OR competence OR capacity OR transmission) AND (USA OR Canada)”. All articles published from 1 January 1999 to 16 August 2017 (end of the search) were included in the selection process using criteria on the language, title, and abstract, as shown in [Table 3](#). In short, selected studies had to be written in English or French, dealing with an epidemiological content about bird susceptibility (host competence, WNV-induced mortality, etc.) to WNV in Canada or the United States. Data on sero-prevalence and host competence were extracted from the retrieved publications. To rank birds species belonging to L3, the standardized WNV sero-positive ratio, or relative ratio, RRs, for each bird species “s” was calculated as, $RR_s = m_s / (\lambda \times n_s)$, where m_s is the number of WNV sero-positive birds of species “s”, n_s is the sample size of the tested birds and $\lambda = \sum m_s / \sum n_s$ is the sero-positive rate under the homogeneous hypothesis; $(\lambda \times n_s)$ is the expected number of WNV sero-positive birds of species “s”.

Tableau 3. – Search strategy for the literature review.

Question	Description	Answer	
		No	Yes/Can't tell
Level 1: Language			
Q1	Is the paper written in English or French? L1 = Q1; eligible for L1 = 1	0	1
Level 2: Title			
Q1	Does the title mention West Nile terms?	0	1
Q2	Does the title mention bird terms?	0	1
Q3	Does the title mention a region of study that is concerned (East Coast USA and Canada)?	0	1
Q4	Does the title mention terms related to seroprevalence, prevalence, competence, capacity or transmission? L2 = Q1 x Q2 (1 + Q3 + Q4); eligible for L2 ≥ 1	0	1
Level 3: Abstract			
Q1	Does the abstract describe search results rather than a method?	0	1
Q2	Does the abstract mention terms related to bird mortality?	0	1
Q3	Does the abstract mention terms related to prevalence or seroprevalence?	0	1
Q4	Does the abstract mention terms relating to host competence ¹ ?	0	1
Q5	Does the abstract mention terms relating to host capacity ² ?	0	1
Q6	Does the abstract specify the regions of study: states of the Eastern migratory corridor for the USA and Canada? L3 = Q1 x Q6 x (1 + Q2 + Q3 + Q4 + Q5); eligible for L3 ≥ 1	0	1
Score = L1 x L2 x L3; eligible for score ≥ 1			

¹=The host competence designates the capability of a host species, birds in this case, of being infected and developing a sufficient viremia for transmitting infectious agents to vectors (Komar, Dohm et al. 1999). ²=The concept of host capacity brings subtlety to the skill of the host. A competent bird can only be involved in the transmission of the virus if it is sufficiently abundant and belongs to the species on which a mosquito competent for WNV feeds. (Bicout 2013)

Migratory status (migratory M, resident R birds or both M and R) and wintering and breeding areas were also added for each bird species. Wintering/breeding areas were defined as the three main regions of the East Atlantic migration corridor: region of Québec QC, North USA and South USA, delimited by the northern border of the states of North Carolina and Tennessee [38]. The two US areas make it possible to take into account short and long distance migration. The migratory status of bird species allowed us to account for the possible geographic origin of WNV infection (acquired in the wintering zone vs. breeding zone) and the possible role of each bird species in the dispersal of WNV in North America.

3. Results

3.1. Wild Bird Mortality Data: List L1

Data from the passive WNV wild bird surveillance are reported below providing Characteristics of bird species, column “Mortality”. We found a list L1=18 that was sorted based on the relative ratio of dead birds positive for WNV, as shown in [Figure 14](#). Of all these bird species, only two (Bald eagle and Blue jay) were under-represented (with the relative ratio of mortality < 1) in mortality data.

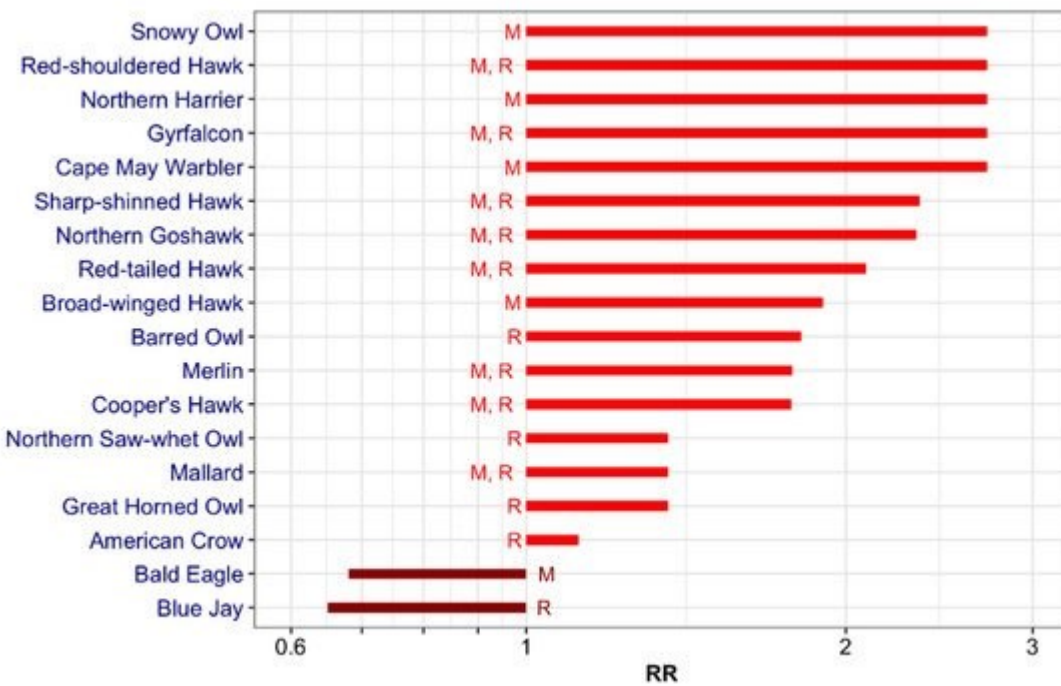


Figure 14. – List L1: ranked list ($n = 18$) of dead birds found by WNV passive bird surveillance.

RR stands for relative risk or ratio of dead birds found positive for WNV. Quoted letters “M” and “R” stand for migratory and resident birds, respectively.

3.2. Blood Meal Analysis: List L2

DNA from 273 engorged mosquitoes was extracted, although only 263 were included in the study as ten did not have a sufficient volume of DNA for amplification with both primer sets. In total, 97 out of 263 (36.9%) were positive using PCR and sequencing with avian primers, whereas 14

out of 263 (5.3%) were positive with PCR and sequencing using mammalian primers. Moreover, 10 out of 263 extracts (four positives with avian primers and six positives with mammalian primers) were reported as indeterminate, as sequencing of the PCR product was not successful and there was insufficient volume remaining for repeat testing, as shown in [Table 4](#).

Tableau 4. – Results of the molecular analysis of blood meals.

Species	Family	Order	N	% of avian (n=97)	% of mammals (n=14)	% of total (n=111)*
Birds						
American robin (<i>Turdus migratorius</i>)	Turdidae	Passeriformes	30	30.9	-	27.0
Common starling (<i>Sturnus vulgaris</i>)	Sturnidae	Passeriformes	11	11.3	-	9.9
Song sparrow (<i>Melospiza melodia</i>)	Emberizidae	Passeriformes	9	9.3	-	8.1
Cedar waxwing (<i>Bombycilla cedrorum</i>)	Bombycillidae	Passeriformes	8	8.2	-	7.2
House sparrow (<i>Passer domesticus</i>)	Passeridae	Passeriformes	7	7.2	-	6.3
Savannah sparrow (<i>Passerculus sandwichensis</i>)	Emberizidae	Passeriformes	4	4.1	-	3.6
Northern cardinal (<i>Cardinalis cardinalis</i>)	Cardinalidae	Passeriformes	3	3.1	-	2.7
Gray catbird (<i>Dumetella carolinensis</i>)	Mimidae	Passeriformes	3	3.1	-	2.7
House finch (<i>Haemorhous mexicanus</i>)	Fringillidae	Passeriformes	3	3.1	-	2.7
Black-capped chickadee (<i>Poecile atricapilla</i>)	Paridae	Passeriformes	3	3.1	-	2.7
Red-winged blackbird (<i>Agelaius phoeniceus</i>)	Icteridae	Passeriformes	2	2.1	-	1.8
Common grackle (<i>Quiscalus quiscula</i>)	Icteridae	Passeriformes	2	2.1	-	1.8
Red-eyed vireo (<i>Vireo olivaceus</i>)	Vireonidae	Passeriformes	2	2.1	-	1.8
Cooper's hawk (<i>Accipiter cooperii</i>)	Accipitridae	Accipitriformes	1	1.0	-	0.9
Green heron (<i>Butorides virescens</i>)	Ardeidae	Pelecaniformes	1	1.0	-	0.9
Northern flicker (<i>Colaptes auratus</i>)	Picidae	Piciformes	1	1.0	-	0.9
American crow (<i>Corvus brachyrhynchos</i>)	Corvidae	Passeriformes	1	1.0	-	0.9
American yellow warbler (<i>Dendroica petechia</i>)	Parulidae	Passeriformes	1	1.0	-	0.9
Ovenbird (<i>Seiurus aurocapilla</i>)	Parulidae	Passeriformes	1	1.0	-	0.9
American goldfinch (<i>Spinus tristis</i>)	Fringillidae	Passeriformes	1	1.0	-	0.9
Chipping sparrow (<i>Spizella passerina</i>)	Emberizidae	Passeriformes	1	1.0	-	0.9
Warbling vireo (<i>Vireo gilvus</i>)	Vireonidae	Passeriformes	1	1.0	-	0.9
Mourning dove (<i>Zenaida macroura</i>)	Columbidae	Passeriformes	1	1.0	-	0.9
Mammals						
White-tailed deer (<i>Odocoileus virginianus</i>)	Cervidae	Artiodactyla	7	-	50.0	6.3
Bovine (<i>Bos taurus</i>)	Bovidae	Artiodactyla	2	-	14.3	1.8
Cat (<i>Felis catus</i>)	Felidae	Carnivora	2	-	14.3	1.8
Human (<i>Homo sapiens</i>)	Hominidae	Primates	2	-	14.3	1.8
Mule deer (<i>Odocoileus hemionus</i>)	Cervidae	Artiodactyla	1	-	7.1	0.9

* of the 273 blood meal samples analyzed, 111 resulted in interpretable sequencing while 162 did not.

Twenty-three (L2=23) different bird species were identified as hosts for CPR mosquitoes, as shown in [Figure 15](#). Most bitten bird species (with relative feeding ≥ 1) belonged to the Passeriformes order, with the American robin (31%; $n = 30$) being the most commonly identified, followed by the Common starling (11.3%; $n = 11$), the Song sparrow (9.3%; $n = 9$) and the Cedar waxwing (8.2%; $n = 8$), as shown in [Figure 15](#) in the left panel. A large proportion of the bird

species (13 out of 23) were represented by only one or two blood meals. White-tailed deer were the most bitten mammal species, while two blood meals were from humans in weeks 27 (first week of July) and 32 (first week of August). Likewise, from the data in [Table 5](#), the most abundant birds (with relative abundance ≥ 1) were Common starling (21%) and Red-winged blackbird (10%), followed by Cedar waxwing, American goldfinch, Chipping sparrow, American robin and American crow (all with 6%), as shown in [Figure 15](#) in the left panel.

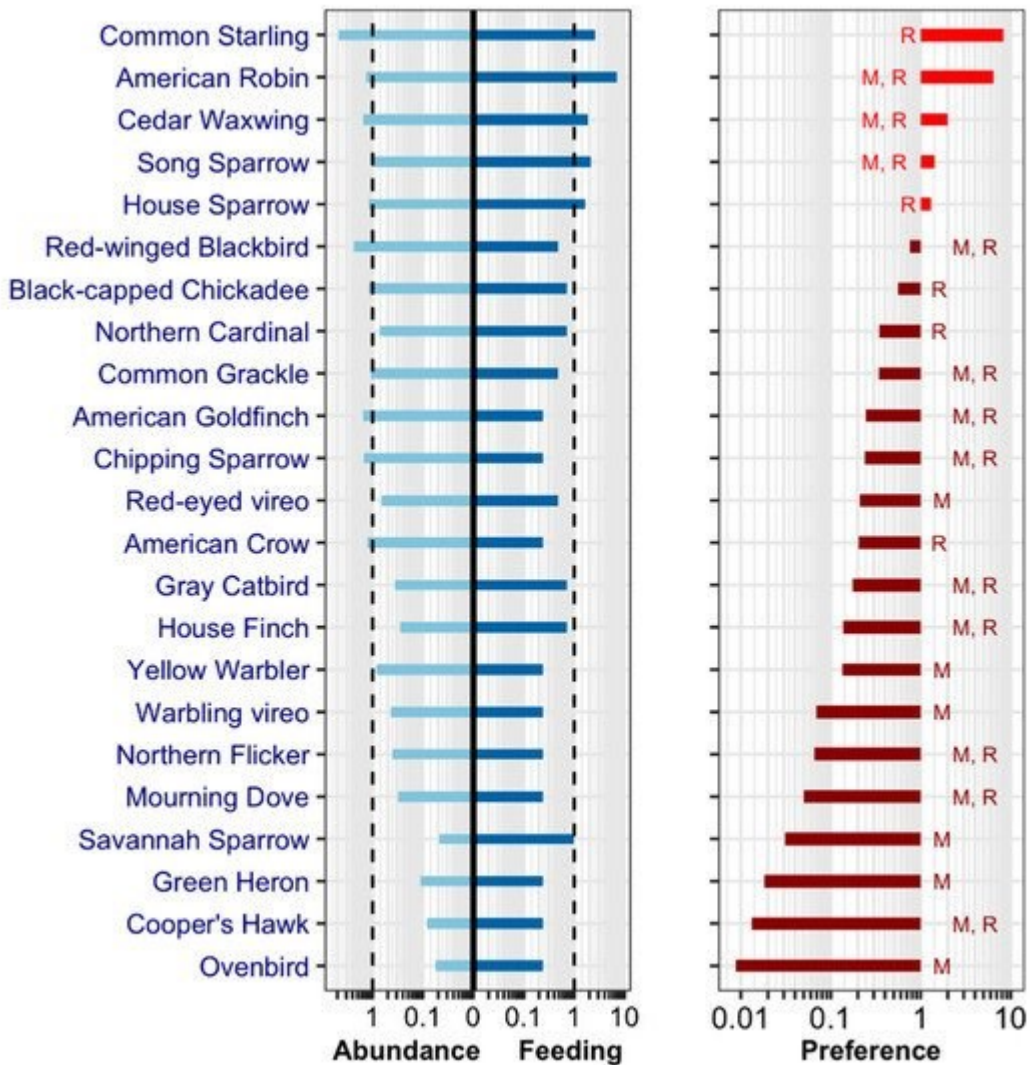


Figure 15. – List L2: ranked list (n = 23) of bird species found from analysis of *Culex pipiens*–restuans (CPR) blood meals.

Left panel: Relative abundance ($\sum a_{is}$) of bird species and relative feeding (fraction of CPR blood meals) ($\sum f_{is}$). Dashed vertical lines at relative abundance and feeding "1" represent the ratio " $1/n$ " where $n = 23$ is the bird species diversity. Right panel: relative host preference ($\sum p_{is}$) of CPR. Quoted letters "M" and "R" stand for migratory and resident birds, respectively.

Tableau 5. – Characteristics of bird species affected by WNV in the Montréal area.

Family	Species (English Name)	Species (Latin Name)	Literature		Mortality, % (n) ³		Abundance ⁴ <i>a_s</i>	CPRfeeding ⁵ <i>f_s</i>	Status ⁶	Wintering Area ⁷	Breeding Area ⁷	Spring Migration
			Seroprevalence (%) ¹ Min (n)–Max (n)	Host Competence ² Min–Max	2001– 2008	2009– 2017						
Anatidae	Canada Goose	<i>Branta canadensis</i>	0.8 (1038)–29 (7)	0.03–0.05					M, R	S	QC, N	March
Anatidae	Wood Duck	<i>Aix sponsa</i>	0 (1)–2.5 (12)			0 (1)			M, R	S	QC, N, S	March
Anatidae	Mallard [†]	<i>Anas platyrhynchos</i>	8 (13)–10.6 (66)	0.48–0.5		50 (4)			M, R	S	QC, N, S	March
Anatidae	Ring-necked Duck	<i>Aythya collaris</i>	5.3 (19)						M, R	S	QC, N	March
Ardeidae	<u>Green Heron</u>	<i>Butorides virescens</i>	100 (1)				0.0049	0.0103	M	S	QC, N, S	April
Accipitridae	Northern Harrier [†]	<i>Circus cyaneus</i>				100 (1)			M	QC, N, S	QC, N	March
Accipitridae	Sharp-shinned Hawk [†]	<i>Accipiter striatus</i>				86.4 (22)			M, R	QC, N, S	QC, N, S	March
Accipitridae	<u>Cooper's Hawk</u> [†]	<i>Accipiter cooperii</i>	100 (1)			65.4 (26)	0.0036	0.0103	M, R	QC, N, S	QC, N, S	March
Accipitridae	Northern Goshawk [†]	<i>Accipiter gentilis</i>				85.7 (7)			M, R	QC, N	QC, N	March
Accipitridae	Bald Eagle [†]	<i>Haliaeetus leucophalus</i>				25 (4)			M	N, S	QC, N, S	March
Accipitridae	Red-shouldered Hawk [†]	<i>Buteo lineatus</i>	100 (1)			100 (5)			M, R	QC, N, S	QC, N, S	March
Accipitridae	Broad-winged Hawk [†]	<i>Buteo platypterus</i>				70 (10)			M	S	QC, N, S	April
Accipitridae	Red-tailed Hawk [†]	<i>Buteo jamaicensis</i>				76.9 (13)	0.0013		M, R	QC, N, S	QC, N, S	March
Charadriidae	Killdeer	<i>Charadrius vociferus</i>		0.84–0.87					M	N, S	QC, N, S	March
Laridae	Ring-billed Gull	<i>Larus delawarensis</i>		1.18–1.26		0 (3)			M, R	QC, N, S	QC, N	February
Columbidae	Rock Pigeon	<i>Columba livia</i>	4.3 (23)–55 (20)	0					R	QC, N, S	QC, N, S	
Columbidae	<u>Mourning Dove</u>	<i>Zenaida macroura</i>	3.8 (26)–57.69 (26)	0–0.19		0 (2)	0.0137	0.0103	M, R	QC, N, S	QC, N, S	April
Cuculidae	Yellow-billed Cuckoo	<i>Coccyzus americanus</i>	5.9 (17)–100 (1)						M		QC, N, S	Mai
Strigidae	Great Horned Owl [†]	<i>Bubo virginianus</i>	44.4 (9)	0.68–0.9		50 (6)			R	QC, N, S	QC, N, S	
Strigidae	Snowy Owl [†]	<i>Bubo scandiacus</i>				100 (2)			M	QC, N		March
Strigidae	Barred Owl [†]	<i>Strix varia</i>				66.7 (3)			R	QC, N, S	QC, N, S	
Strigidae	Northern Saw-whet Owl [†]	<i>Aegolius acadicus</i>				50 (8)			R	QC, N	QC, N	
Picidae	Hairy Woodpecker	<i>Picoides villosus</i>	0 (14)–14.3 (7)						R	QC, N, S	QC, N, S	
Picidae	<u>Northern Flicker</u>	<i>Colaptes auratus</i>		0.06–0.14			0.0178	0.0103	M, R	N, S	QC, N, S	April
Picidae	Pileated Woodpecker	<i>Dryocopus pileatus</i>	20 (5)						R	QC, N, S	QC, N, S	
Falconidae	American Kestrel	<i>Falco sparverius</i>	16 (152)–100 (1)	0.79–0.93	0 (1)	0 (5)			M, R	QC, N, S	QC, N, S	April
Falconidae	Merlin [†]	<i>Falco columbarius</i>	100 (1)			65.5 (55)			M, R	QC, N, S	QC, N	March
Falconidae	Gyr Falcon [†]	<i>Falco rusticolus</i>				100 (1)			M, R	QC		
Tyrannidae	Great Crested Flycatcher	<i>Myiarchus crinitus</i>	2 (50)						M		QC, N, S	May
Vireonidae	<u>Warbling vireo</u>	<i>Vireo gilvus</i>					0.0189	0.0103	M		QC, N, S	May
Vireonidae	<u>Red-eyed vireo</u>	<i>Vireo olivaceus</i>					0.0288	0.0206	M		QC, N, S	May
Corvidae	Blue Jay [†]	<i>Cyanocitta cristata</i>	0.8 (121)–35.8 (134)	2.39–2.55	23.6 (886)	66.7 (6)	0.0093		R	QC, N, S	QC, N, S	

Corvidae	<u>American Crow</u> †	<i>Corvus brachyrhynchos</i>	3.2 (157)–68.3 (183)	1.04–1.62	40.1 (1418)	73.9 (46)	0.0549	0.0103	R	QC, N, S	QC, N, S	
Hirundinidae	Tree Swallow	<i>Tachycineta bicolor</i>	2.6 (156)						M	S	QC, N, S	March
Paridae	<u>Black-capped Chickadee</u>	<i>Poecile atricapillus</i>	0 (107)				0.0511	0.0309	R	QC, N	QC, N	
Sittidae	White-breasted Nuthatch	<i>Sitta carolinensis</i>	0 (40)–2.9 (35)						R	QC, N, S	QC, N, S	
Troglodytidae	House Wren	<i>Troglodytes aedon</i>	5.9 (17)						M	S	QC, N, S	April
Turdidae	Eastern Bluebird	<i>Sialia sialis</i>	2.4 (126)						M, R	N, S	QC, N, S	March
Turdidae	Swainson's Thrush	<i>Catharus ustulatus</i>	2.13 (47)–3.1 (32)						M		QC, N	May
Turdidae	Wood Thrush	<i>Hylocichla mustelina</i>	1 (101)–15.6 (32)						M		QC, N, S	May
Turdidae	<u>American Robin</u>	<i>Turdus migratorius</i>	2.6 (76)–10.11 (366)	1.04–1.1			0.0578	0.3093	M, R	QC, N, S	QC, N, S	April
Mimidae	<u>Gray Catbird</u>	<i>Dumetella carolinensis</i>	3.5 (2706)–35 (17)	0.07–0.1			0.0158	0.0309	M, R	N, S	QC, N, S	May
Mimidae	Brown Thrasher	<i>Toxostoma rufum</i>	3.7 (643)–10.5 (19)						M, R	N, S	QC, N, S	April
Sturnidae	<u>Common Starling</u>	<i>Sturnus vulgaris</i>		0.16–0.22			0.2045	0.1134	R	QC, N, S	QC, N, S	
Bombycillidae	<u>Cedar Waxwing</u>	<i>Bombycilla cedrorum</i>	20 (5)				0.0671	0.0825	M, R	QC, N, S	QC, N, S	March
Parulidae	<u>Ovenbird</u>	<i>Seiurus aurocapilla</i>	0.9 (115)–3.1 (32)				0.0024	0.0103	M	S	QC, N, S	May
Parulidae	Common Yellowthroat	<i>Geothlypis trichas</i>	0.7 (299)						M	S	QC, N, S	May
Parulidae	American Redstart	<i>Setophaga ruticilla</i>	0.4 (280)						M	S	QC, N, S	May
Parulidae	Cape May Warbler †	<i>Setophaga tigrina</i>				100 (1)			M		QC, N	May
Parulidae	Northern Parula	<i>Setophaga americana</i>	4.7 (43)						M	S	QC, N, S	May
Parulidae	<u>Yellow Warbler</u>	<i>Setophaga petechia</i>		1			0.0368	0.0103	M		QC, N, S	April
Passerellidae	<u>Chipping Sparrow</u>	<i>Spizella passerina</i>	3 (59)				0.0652	0.0103	M, R	S	QC, N, S	April
Passerellidae	<u>Savannah Sparrow</u>	<i>Passerculus sandwichensis</i>					0.0021	0.0412	M	S	QC, N	April
Passerellidae	<u>Song Sparrow</u>	<i>Melospiza melodia</i>	0 (13)–3.4 (88)	1.2			0.0431	0.0928	M, R	QC, N, S	QC, N, S	April
Passerellidae	Eastern Towhee	<i>Pipilo erythrophthalmus</i>	0.7 (144)–9.6 (197)						M	N, S	QC, N, S	April
Cardinalidae	Scarlet Tanager	<i>Piranga olivacea</i>	2.8 (71)						M		QC, N, S	April
Cardinalidae	<u>Northern Cardinal</u>	<i>Cardinalis cardinalis</i>	6.2 (503)–52.2 (115)	0.38			0.0313	0.0309	R	QC, N, S	QC, N, S	
Cardinalidae	Rose-breasted Grosbeak	<i>Pheucticus ludovicianus</i>	1 (98)–5 (22)						M		QC, N	April
Cardinalidae	Indigo Bunting	<i>Passerina cyanea</i>	3.6 (28)–2.2 (223)						M	S	QC, N, S	April
Icteridae	Eastern Meadowlark	<i>Sturnella magna</i>	100 (1)						M	N, S	QC, N, S	March
Icteridae	Baltimore Oriole	<i>Icterus galbula</i>	8.3 (12)						M	S	QC, N, S	May
Icteridae	<u>Red-winged Blackbird</u>	<i>Agelaius phoeniceus</i>	0 (63)–10.5 (67)	0.9–0.99			0.1036	0.0206	M, R	QC, N, S	QC, N, S	March
Icteridae	Brown-headed Cowbird	<i>Molothrus ater</i>	1.8 (494)–12.5 (24)	0					M, R	QC, N, S	QC, N	April
Icteridae	<u>Common Grackle</u>	<i>Quiscalus quiscula</i>	0 (106)–15.4 (13)	1.39–2.04			0.0462	0.0206	M, R	QC, N, S	QC, N, S	March
Fringillidae	<u>House Finch</u>	<i>Haemorhous mexicanus</i>	2 (927)–100 (5)	1.29–1.8			0.0125	0.0309	M, R	QC, N, S	QC, N, S	March
Fringillidae	<u>American Goldfinch</u>	<i>Spinus tristis</i>	0.3 (337)–3.1 (128)				0.0666	0.0103	M, R	QC, N, S	QC, N, S	February

Passeridae	<u>House Sparrow</u>	<i>Passer domesticus</i>	1.6 (1042)–51 (107)	1.25–1.6	0 (1)	0.0508	0.0722	R	QC, N, S	QC, N, S
------------	----------------------	--------------------------	---------------------	----------	-------	--------	--------	---	----------	----------

Species = bird species for which blood meal data are available in our study area ($n = 20$); † = bird species for which mortality data are available in available study area ($n = 18$); ¹ Minimum and maximum percentages of WNV sero-positive birds ($n =$ sample size) [6,7,18,39–48]; ² Minimum and maximum index of host competence for WNV [20,49,50]; ³ Percentage of dead birds positive for WNV ($n =$ sample size) (CWHC); ⁴ a_s is the density of species s divided by the total density of the avian community—data come from the EPOQ database. The sum of all a_s is equal to one; ⁵ f_i is the fraction of total blood meals taken by *Cx. pipiens—restuans* from host s [9]. The sum of all f_i is equal to one; ⁶ M: Migratory bird species; R: Resident bird species; ⁷ S: South USA; N: North USA; QC: Québec.

To explore the feeding preference of CPR, the list L2 was sorted based on the value of p_s , as shown in [Figure 15](#) in the right panel. Of these, the highest ranked species (with relative feeding preference ≥ 1) were (descending order): Common starling, American robin, Song sparrow and House sparrow. All other bird species were associated with a relative feeding preference lower than 1, suggesting that, while very abundant (as with Red-winged blackbirds), these species are not fed upon by CPR mosquitoes, as shown in [Figure 15](#).

Analysis of Seasonal Bird-To-Mammal Feeding Shift of CPR Mosquitoes

There was a significant shift in the proportion of blood meals obtained from mammals compared to birds over the season (coefficient = -0.27 (95% confidence interval = -0.47 ; -0.06), $p < 0.01$). The shift appeared to be gradual and continuous from week 26 onwards, with an odds ratio of change in the proportion of blood meals from birds of 0.76 (95% confidence interval = 0.62 – 0.94) per week, as shown in [Figure 16](#).

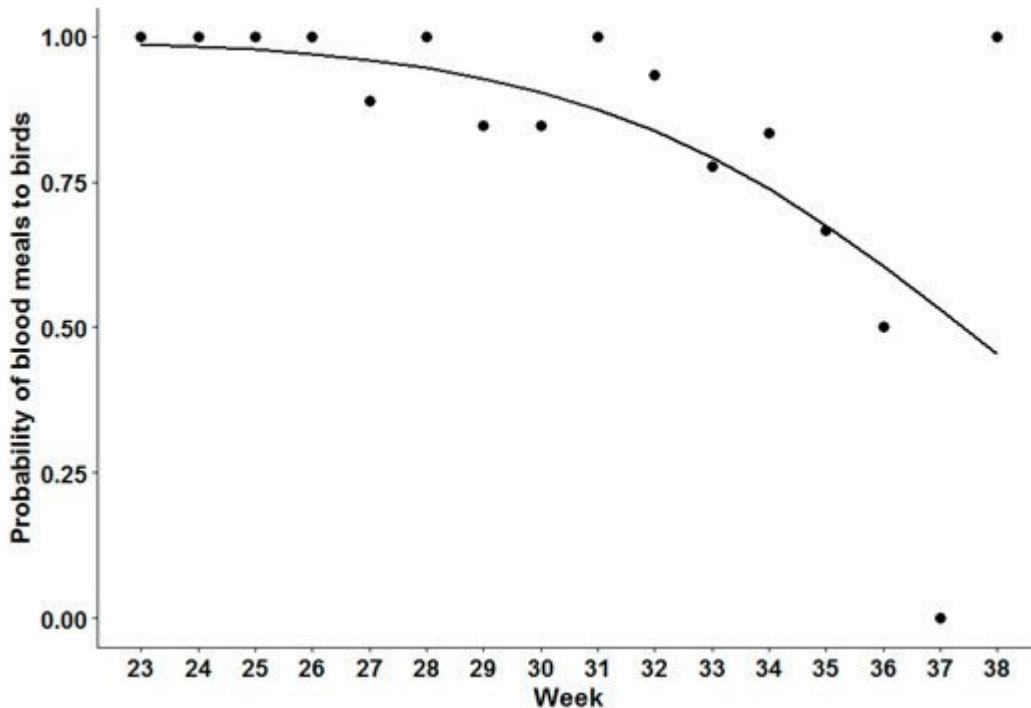


Figure 16. – Weekly proportion of *Culex pipiens–restuans* blood meals taken from birds of all species.

Data points correspond to field data and the solid line through the data corresponds to the predicted proportions using the logistic regression model.

3.3. Literature Review: List L3

The literature search identified a total of 1244 articles, 23 of which met the selection criteria, as shown in [Figure 17](#). As a result, we found a list L3=53 that was sorted based on the relative ratio of sero-positives, as shown in [Figure 18](#), as follows: 22 bird species were found most often sero-positive for WNV (with the relative ratio of sero-positives ≥ 1) and the top five species were Red-shouldered hawk, Merlin, Green heron, Eastern meadowlark and Cooper’s hawk (all with the same ratio of about 4). Conversely, 31 bird species rarely had serological evidence of exposure to WNV with American redstart having the lowest sero-prevalence.

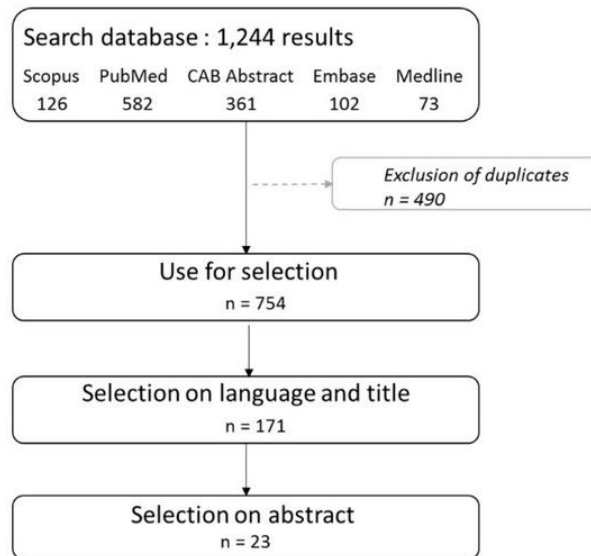


Figure 17. – Selection process of articles and the result of the literature review.

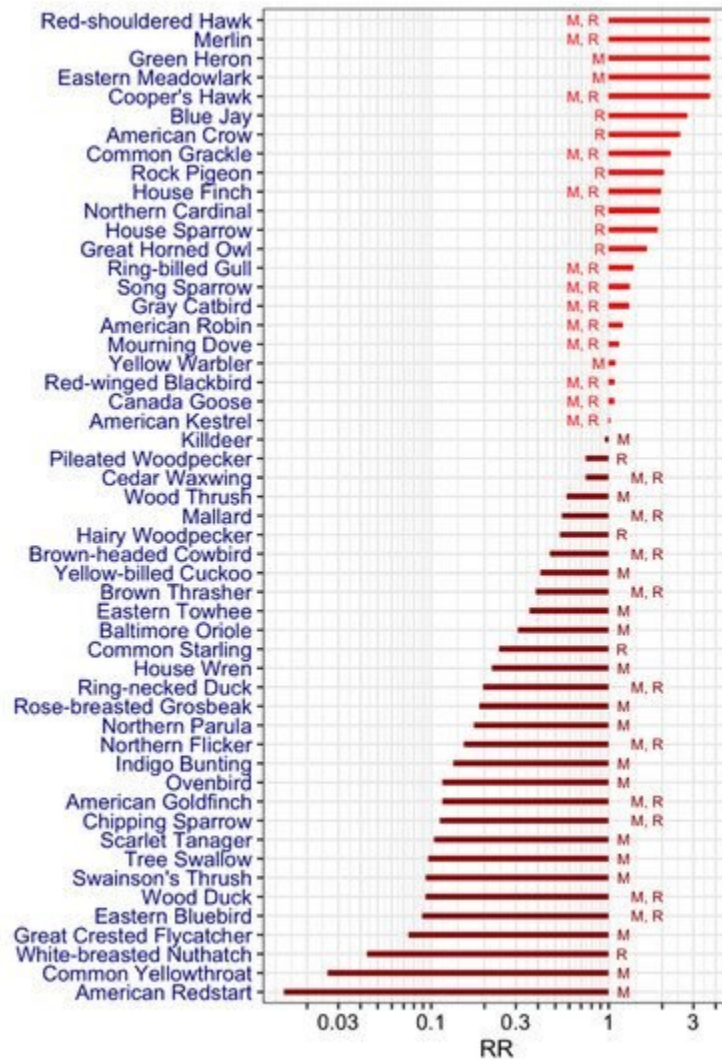


Figure 18. – List L3: ranked list ($n = 53$) of bird species found from the literature review.

RR stands for relative risk or ratio of sero-positives. Quoted letters “M” and “R” stand for migratory and resident birds, respectively.

3.4. Final List: Lf

The distribution of the species we identified among the lists is as follows: L1=18 (mortality data of wild birds), L2=23 (blood meal analysis of the *CPR*) and L3=53 (literature review) with the number of common species, $L1 \cap L2 = 2$, $L1 \cap L3 = 7$ and $L2 \cap L3 = 20$, and $L1 \cap L2 \cap L3 = 2$ species (American crow and Cooper’s hawk) belonging to all three lists. The final list of 67 bird species was obtained as, $67 = [L1 + L2 + L3 - L1 \cap L2 - L1 \cap L3 - L2 \cap L3 + L1 \cap L2 \cap L3] = 18 + 23 + 53 - 2 - 7 - 20 + 2$,

representing 21% of L0=318 species from the Avibase database [27], which includes all the species present in the Montréal area. [Table 5](#) presents the summary results of the characteristics of each of the selected 67 bird species of interest. Characteristic variables include data on bird mortality, bird abundance, CPR feeding preference and sero-prevalence for WNV, host competence, migratory status and sites for wintering and breeding extracted from the literature.

4. Discussion

In this study, we constructed a priority list of bird species potentially involved in the transmission of WNV in the greater Montréal region. We constructed this list by combining three sources of data: (i) results from WNV surveillance in wild (dead) birds in the province (2002–2015); (ii) evidence from molecular blood meal analysis that selected bird species are fed upon by CPR, the primary enzootic vectors of WNV in the region, collected in mosquito surveillance in the study area in 2008 and 2014; and (iii) a literature review on evidence for exposure to WNV (sero-prevalence) and the host competence of resident bird species. There were 67 breeding species identified by these data sources, which highlights the potential complexity of WNV transmission cycles in Québec.

Out of the 67 bird species, host competences were documented for 22 bird species, including eight highly competent (competence > 1) bird species ranked as follows (from the most to the least competent): Blue jay, Common grackle, House finch, House sparrow, Song sparrow, American robin, American crow and Ring-billed gull. American crows and Blue jays were used as indicators of local WNV circulation at the beginning of the epidemics [52,53,54]. In addition, both of these species exhibit high viremia when infected [20], though mortality rates are high in both species. The mortality of infected birds shortens the overall period of virus transmission, but some infected bird species can maintain sufficiently high viremia to infect many mosquitoes during the time from disease onset to death. Not all bird species are susceptible to mortality from WNV. For example, WNV amplification in California is driven primarily by house finches, which rarely die from WNV infection, and *Culex tarsalis* as the main vector species [55].

Blood meal analysis data identified 23 bird species as potential hosts for CPR mosquitoes. Most bird species bitten by CPR mosquitoes were (from most to least preferred): Common startling,

American robins, Cedar waxwing, Song sparrow and House sparrow. The preference of CPR to feed upon American robins has been reported in other studies (e.g., in [13,56]) and all species, except Cedar waxwings, are competent reservoirs for WNV in at least one study, as shown in [Table 4](#). Bird species other than American robins likely play a role in WNV transmission, particularly as some, including some sparrow species, may have greater capacity to transmit WNV (due to longer duration and higher viremia) than American robins.

The role of the species other than American robins in the transmission of WNV could also be related to possible transmission by competent vectors other than CPR. In eastern Canada, for example, *Aedes vexans*, a widespread mosquito, is competent to transmit WNV, but it prefers to feed upon mammals and only occasionally feeds on birds [11,57,58].

Other studies have found that House sparrows are under-represented as hosts for mosquitoes relative to their densities [13,56], while in our study they appeared over-represented. To what extent these observations may be driven by regional factors, such as climate affecting bird population densities, or the relatively urbanized nature of the study area, requires further study. Mosquitoes that were collected as part of a routine entomological WNV surveillance in CO₂-baited CDC light traps [11] and gravid traps, that purport to attract greater numbers of engorged mosquitoes [59], were not used. We could not rule out the possibility that this could affect comparisons with the results of studies in which gravid traps were used, although different findings using gravid and light traps regarding blood meals have not been reported [13].

We observed a shift in feeding behavior from birds to mammals, as reported in other studies [13,60,61]. Almost all CPR blood meals were taken from birds in early summer (week 23), while the ratio of bird to mammal blood meals started to decline around mid-July. However, as pointed out by others [56] the main shift in mosquito feeding from birds to mammals occurred in parallel with the onset of reported human cases (which, in Québec, usually happens during surveillance weeks 28–31 [62]). The date of acquisition of cases reported in human-case surveillance is likely several weeks before the date of reporting in surveillance [63], so while a shift of feeding behavior from birds to mammals (including humans) may contribute to the seasonal pattern of WNV infection in humans, it is unlikely to be the main cause.

5. Conclusions

These findings indicate a broad similarity in the ecology of WNV in the study region and regions in the US. We noted a similar range of key avian reservoir host species and seasonal change in host selection by mosquitoes. This work has shed light on the involvement of American robins and other bird species in the circulation of the WNV in southern Québec. However, the relative importance of some bird species as hosts of CPR and WNV in the greater Montréal area may be somewhat different to that occurring in northeastern US, and field studies are needed to confirm this and explore the consequences for the risk of WNV to the human population. In addition, studies both in the field and using modeling are necessary to elucidate the roles of each bird species, which would help to synthesize and consolidate knowledge regarding the eco-epidemiology of WNV in this area. These types of studies would allow us to improve the surveillance, control and management of WNV and possibly other vector-borne wildlife diseases, which are becoming increasingly important in North America [[64](#),[65](#),[66](#)].

Author Contributions

Conceptualization, A.L. and D.J.B.; methodology, D.J.B.; formal analysis, L.T.; data curation, L.T.; molecular analysis, R.L.L. and M.I.; writing—original draft preparation, L.T., A.L. and D.J.B.; writing—review and editing, L.T., A.L., N.H.O., R.L.L., M.I., C.A.G. and D.J.B.; supervision, A.L. and D.J.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This research received no external funding.

Acknowledgments

The authors thank all the workers from MSSS, RQO and CWHC who collected and reported the data used in this study. This study was funded by the Public Health Agency of Canada, ComUE-UGA and IDEX “Université Grenoble Alpes: Université de l’innovation”. CRIPA is a research center financially supported by the Fonds de recherche Québec Nature et Technologies (FRQNT).

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Smithburn, K.C.; Hughes, T.P.; Burke, A.W.; Paul, J.H. A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1940**, *s1–s20*, 471–492.
2. Work, T.H.; Hurlbut, H.S.; Taylor, R.M. Isolation of West Nile virus from hooded crow and rock pigeon in the Nile delta. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1953**, *84*, 719–722.
3. Taylor, R.M.; Work, T.H.; Hurlbut, H.S.; Rizk, F. A Study of the Ecology of West Nile Virus in Egypt. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1956**, *5*, 579–620.
4. Petersen, L.R.; Brault, A.C.; Nasci, R.S. West Nile virus: Review of the literature. *JAMA* **2013**, *310*, 308–315.
5. Garmendia, A.E.; Van Kruiningen, H.J.; French, R.A. The West Nile virus: Its recent emergence in North America. *Microb. Infect.* **2001**, *3*, 223–229.
6. Komar, N.; Panella, N.A.; Boyce, E. Exposure of domestic mammals to West Nile virus during an outbreak of human encephalitis, New York City, 1999. *Emerg. Infect. Dis.* **2001**, *7*, 736–738.
7. Komar, N.; Panella, N.A.; Burns, J.E.; Dusza, S.W.; Mascarenhas, T.M.; Talbot, T.O. Serologic evidence for West Nile virus infection in birds in the New York City vicinity during an outbreak in 1999. *Emerg. Infect. Dis.* **2001**, *7*, 621–625.
8. Gancz, A.Y.; Campbell, D.G.; Barker, I.K.; Lindsay, R.; Hunter, B. Detecting West Nile Virus in Owls and Raptors by an Antigen-capture Assay. *Emerg. Infect. Dis.* **2004**, *10*, 2204–2206.
9. INSPQ. *Proposition d'un Programme de Surveillance Entomologique du Virus du Nil Occidental au Québec—Avis Scientifique*; Institut National de Santé Publique du Québec: Quebec City, QC, Canada, 2015.

10. Dauphin, G.; Zientara, S.; Zeller, H.; Murgue, B. West Nile: Worldwide current situation in animals and humans. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2004**, *27*, 343–355.
11. Ripoche, M.; Ludwig, A.; Campagna, C.; Ludwig, A.; Ogden, N.H.; Leighton, P.A. Short-term Forecasting of Daily Abundance of West Nile Virus Vectors *Culex pipiens-restuans* (Diptera: Culicidae) and *Aedes vexans* Based on Weather Conditions in Southern Québec (Canada). *J. Med. Entomol.* **2019**, *56*, 859–872.
12. Kilpatrick, A.M.; Daszak, P.; Jones, M.J.; Marra, P.P.; Kramer, L.D. Host heterogeneity dominates West Nile virus transmission. *Proc. Biol. Sci.* **2006**, *273*, 2327–2333.
13. Kilpatrick, A.M.; Kramer, L.D.; Jones, M.J.; Marra, P.P.; Daszak, P. West Nile Virus Epidemics in North America Are Driven by Shifts in Mosquito Feeding Behavior. *PLoS Biol.* **2006**, *4*, e82.
14. Andreadis, T.G. The contribution of *Culex pipiens* complex mosquitoes to transmission and persistence of West Nile virus in North America. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **2012**, *28* (Suppl. 4), 137–151.
15. Rappole, J.H.; Derrickson, S.R.; Hubalek, Z. Migratory birds and spread of West Nile virus in the Western Hemisphere. *Emerg. Infect. Dis.* **2000**, *6*, 319–328.
16. Peterson, A.T.; Vieglais, D.A.; Andreasen, J.K. Migratory birds modeled as critical transport agents for West Nile Virus in North America. *Vector-Borne Zoonotic Dis* **2003**, *3*, 27–37.
17. Jourdain, E.; Gauthier-Clerc, M.; Bicout, D.J.; Sabatier, P. Bird Migration Routes and Risk for Pathogen Dispersion into Western Mediterranean Wetlands. *Emerg. Infect. Dis.* **2007**, *13*, 365–372.
18. Dusek, R.J.; McLean, R.G.; Kramer, L.D.; Ubico, S.R.; Dupuis, A.P.; Ebel, G.D.; Gupstill, S.C. Prevalence of West Nile virus in migratory birds during spring and fall migration. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2009**, *81*, 1151–1158.

19. Owen, J.C.; Nakamura, A.; Coon, C.A.; Martin, L.B. The effect of exogenous corticosterone on West Nile virus infection in Northern Cardinals (*Cardinalis cardinalis*). *Vet. Res.* **2012**, *43*, 34.
20. Komar, N.; Langevin, S.; Hinten, S.; Nemeth, N.; Edwards, E.; Hettler, D.L.; David, B.S.; Bowen, R.A.; Bunning, M.L. Experimental Infection of North American Birds with the New York 1999 Strain of West Nile Virus. *Emerg. Infect. Dis.* **2003**, *9*, 311–322.
21. Marra, P.; Griffing, S.; Caffrey, C.; Kilpatrick, A.; McLean, R.; Brand, C.; Saito, E.; Dupuis, A.; Kramer, L.; Novak, R. West Nile Virus and Wildlife. *BioScience* **2004**, *54*, 393–402.
22. Thomas-Bachli, A.L.; Pearl, D.L.; Berke, O.; Parmley, E.J.; Barker, I.K. A comparison of West Nile virus surveillance using survival analyses of dead corvid and mosquito pool data in Ontario, 2002–2008. *Prev. Vet. Med.* **2015**, *122*, 363–370.
23. Vekslar, A.; Eidson, M.; Zurbenko, I. Assessment of methods for prediction of human West Nile virus (WNV) disease from WNV-infected dead birds. *Emerg. Themes Epidemiol.* **2009**, *6*, 4.
24. LaDeau, S.L.; Kilpatrick, A.M.; Marra, P.P. West Nile virus emergence and large-scale declines of North American bird populations. *Nature* **2007**, *447*, 710–713.
25. Fougères, D.; Macleod, R. *Montreal: The History of a North American City*; McGill-Queen's University Press: Montreal, QC, Canada, 2017.
26. StatisticsCanada. Land Cover and Land Use Montreal. 2016. Available online: <http://www.statcan.gc.ca/pub/16-201-x/2016000/c-g/c-g03-29-eng.htm> (accessed on 17 June 2019).
27. Lepage, D. Avibase—Listes D'oiseaux Mondiales Montérégie: Montréal. 2017. Available online: <https://avibase.bsc-eoc.org/checklist.jsp?region=caqc05&list=howardmoore&lang=FR> (accessed on 21 May 2020).

28. Drebot, M.A.; Lindsay, R.; Barker, I.K.; Buck, P.A.; Fearon, M.; Hunter, F.; Sockett, F.; Artsob, H. West Nile virus surveillance and diagnostics: A Canadian perspective. *Can. J. Infect. Dis.* **2003**, *14*, 105–114.
29. Lindsay, R.; Barker, I.; Nayar, G.; Drebot, M.; Calvin, S.; Scammell, C.; Sachvie, C.; La Fleur, T.; Dibernardo, A.; Andonova, M.; et al. Rapid Antigen-Capture Assay To Detect West Nile Virus in Dead Corvids. *Emerg. Infect. Dis.* **2003**, *9*, 1406–1410.
30. CWHC. Le Virus du Nil Occidental. 2016. Available online: http://fr.cwhc-rccsf.ca/west_nile_virus.php (accessed on 20 July 2016).
31. Molaei, G.; Thomas, M.C.; Muller, T.; Medlock, J.; Shepard, J.J.; Armstrong, P.M.; Andreadis, T.G. Dynamics of Vector-Host Interactions in Avian Communities in Four Eastern Equine Encephalitis Virus Foci in the Northeastern U.S. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0004347.
32. Rizzoli, A.; Bolzoni, L.; Chadwick, E.A.; Capelli, G.; Montarsi, F.; Grisenti, M.; de la Puente, J.M.; Munoz, J.; Figuerola, J.; Soriguer, R.; et al. Understanding West Nile virus ecology in Europe: *Culex pipiens* host feeding preference in a hotspot of virus emergence. *Parasit. Vectors* **2015**, *8*, 213.
33. Balenghien, T.; Fouque, F.; Sabatier, P.; Bicout, D.J. Theoretical Formulation for Mosquito Host-Feeding Patterns: Application to a West Nile Virus Focus of Southern France. *J. Med. Entomol.* **2011**, *48*, 1076–1090.
34. Bicout, D.J. *Le virus du Nil occidental*; Éditions Quæ: Versailles, France, 2013; p. 239.
35. Regroupement Québec Oiseaux. Etude des Populations d’oiseaux du Québec. 2018. Available online: <https://www.oiseauxqc.org/epoq.jsp> (accessed on 15 October 2018).
36. Farajollahi, A.; Fonseca, D.M.; Kramer, L.D.; Kilpatrick, A.M. “Bird biting” mosquitoes and human disease: A review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. *Infect. Genet. Evolut.* **2011**, *11*, 1577–1585.

37. R Foundation for Statistical Computing. Available online: <http://www.R-project.org> (accessed on 21 May 2020).
38. Peterson, R.T.; Peterson, V.M. *Les Oiseaux du Québec et de l'Est de l'Amérique du Nord*, 5th ed.; Broquet: Saint-Constant, QC, Canada, 2004.
39. Komar, N.; Dohm, D.J.; Turell, M.J.; Spielman, A. Eastern equine encephalitis virus in birds: Relative competence of European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1999**, *60*, 387–391.
40. Ringia, A.M.; Blitvich, B.J.; Koo, H.Y.; Van de Wyngaerde, M.; Brawn, J.D.; Novak, R.J. Antibody prevalence of West Nile virus in birds, Illinois, 2002. *Emerg. Infect. Dis.* **2004**, *10*, 1120–1124.
41. Godsey, M.S., Jr.; Blackmore, M.S.; Panella, N.A.; Burkhalter, K.; Gottfried, K.; Halsey, L.A.; Rutledge, R.; Langevin, S.A.; Gates, R. West Nile virus epizootiology in the southeastern United States, 2001. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2005**, *5*, 82–89.
42. Komar, N.; Panella, N.A.; Langevin, S.A.; Brault, A.C.; Amador, M.; Edwards, E.; Owen, J.C. Avian hosts for West Nile virus in St. Tammany Parish, Louisiana, 2002. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2005**, *73*, 1031–1037.
43. Gibbs, S.E.; Allison, A.B.; Yabsley, M.J.; Mead, D.G.; Wilcox, B.R.; Stallknecht, D.E. West Nile virus antibodies in avian species of Georgia, USA: 2000–2004. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2006**, *6*, 57–72.
44. Loss, S.R.; Hamer, G.L.; Walker, E.D.; Ruiz, M.O.; Goldberg, T.L.; Kitron, U.D.; Brawn, J.D. Avian host community structure and prevalence of West Nile virus in Chicago, Illinois. *Oecologia* **2009**, *159*, 415–424.
45. Dubé, M.C.; Bird, D.M.; Dibernardo, A.; Lindsay, L.R.; Charest, H. Prevalence of West Nile virus in wild American Kestrels (*Falco sparverius*) of southern Quebec, Canada. *J. Wildl. Dis.* **2010**, *46*, 603–607.

46. Chuang, T.W.; Knepper, R.G.; Stanuszek, W.W.; Walker, E.D.; Wilson, M.L. Temporal and spatial patterns of West Nile virus transmission in Saginaw County, Michigan, 2003–2006. *J. Med. Entomol.* **2011**, *48*, 1047–1056.
47. Kilpatrick, A.M.; Peters, R.J.; Dupuis, A.P., 2nd; Jones, M.J.; Marra, P.P.; Kramer, L.D. Predicted and observed mortality from vector-borne disease in small songbirds. *Biol. Conserv.* **2013**, *165*, 79–85.
48. Komar, N.; Panella, N.A.; Young, G.R.; Brault, A.C.; Levy, C.E. Avian hosts of West Nile virus in Arizona. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2013**, *89*, 474–481.
49. Randall, N.J.; Blitvich, B.J.; Blanchong, J.A. Association between agricultural land use and West Nile virus antibody prevalence in Iowa birds. *J. Wildl. Dis.* **2013**, *49*, 869–878.
50. Kilpatrick, A.M.; LaDeau, S.L.; Marra, P.P. Ecology of West Nile Virus Transmission and its Impact on Birds in the Western Hemisphere. *The Auk* **2007**, *124*, 1121–1136.
51. Wheeler, S.S.; Barker, C.M.; Fang, Y.; Armijos, M.V.; Carroll, B.D.; Husted, S.; Johnson, W.O.; Reisen, W.K. Differential impact of West Nile Virus on California birds. *The Condor* **2009**, *111*, 1–20.
52. Ludwig, A.; Bigras-Poulin, M.; Michel, P.; Belanger, D. Risk factors associated with West Nile virus mortality in American Crow populations in Southern Quebec. *J. Wildl. Dis.* **2010**, *46*, 195–208.
53. Foppa, I.M.; Beard, R.H.; Mendenhall, I.H. The impact of West Nile virus on the abundance of selected North American birds. *BMC Vet. Res.* **2011**, *7*, 43.
54. Thomas-Bachli, A.L.; Pearl, D.L.; Parmley, E.J.; Berke, O. The Influence of Sociodemographic Factors on the Engagement of Citizens in the Detection of Dead Corvids during the Emergence of West Nile Virus in Ontario, Canada. *Front. Vet. Sci.* **2020**, *6*, 483.
55. Worwa, G.; Hutton, A.A.; Brault, A.C.; Reisen, W.K. Comparative fitness of West Nile virus isolated during California epidemics. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2019**, *13*, e0007135.

56. Hamer, G.L.; Kitron, U.D.; Goldberg, T.L.; Brawn, J.D.; Loss, S.R.; Ruiz, M.O.; Hayes, D.B.; Walker, E.D. Host selection by *Culex pipiens* mosquitoes and west Nile virus amplification. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2009**, *80*, 268–278.
57. Andreadis, T.G.; Anderson, J.F.; Vossbrinck, C.R.; Main, A.J. Epidemiology of West Nile virus in Connecticut: A five-year analysis of mosquito data 1999–2003. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2004**, *4*, 360–378.
58. Giordano, B.V.; Turner, K.W.; Hunter, F.F. Geospatial Analysis and Seasonal Distribution of West Nile Virus Vectors (Diptera: Culicidae) in Southern Ontario, Canada. *Int. J. Env. Res. Pub. Health* **2018**, *15*.
59. Silver, J.B. CHAP2: Sampling the Egg Population. In *Mosquito Ecology—Field Sampling Methods*, 3rd ed.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2018; pp. 25–136.
60. Kilpatrick, A.M.; Kramer, L.D.; Campbell, S.R.; Alleyne, E.O.; Dobson, A.P.; Daszak, P. West Nile virus risk assessment and the bridge vector paradigm. *Emerg. Infect. Dis.* **2005**, *11*, 425–429.
61. Kilpatrick, A.M.; Kramer, L.D.; Campbell, S.R.; Alleyne, E.O.; Dobson, A.P.; Daszak, P. Supersuppression: Reservoir Competency and Timing of Mosquito Host Shifts Combine to Reduce Spillover of West Nile Virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2016**, *95*, 1174–1184.
62. West Nile virus and other mosquito-borne diseases national surveillance report. Available online: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/diseases/west-nile-virus/west-nile-virus-other-mosquito-borne-disease.html> (accessed on 21 May 2020).
63. Ogden, N.H.; Ludwig, A.; Morse, A.P.; Zheng, H.; Zhu, H. Weather-based forecasting of mosquito-borne disease outbreaks in Canada. *Can Commun. Dis. Rep.* **2019**, *45*, 127–132.
64. McDonald, E.; Martin, S.W.; Landry, K.; Gould, C.V.; Lehman, J.; Fischer, M.; Lindsey, N.P. West Nile Virus and Other Domestic Nationally Notifiable Arboviral Diseases—United States, 2018. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2019**, *68*, 673–678.

65. Ronca, S.E.; Murray, K.O.; Nolan, M.S. Cumulative Incidence of West Nile Virus Infection, Continental United States, 1999–2016. *Emerg. Infect. Dis.* **2019**, *25*, 325–327.
66. Mermel, L.A. Association of Human Eastern Equine Encephalitis with Precipitation Levels in Massachusetts. *JAMA Netw. Open* **2020**, *3*, e1920261.

© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Discussion Générale

L'objectif principal de cette étude est de dresser une liste des oiseaux potentiellement impliqués dans la transmission et la circulation du VNO dans le sud du Québec. Ce faisant, nous avons utilisé l'analyse des repas sanguins du moustique CPR pour déterminer les espèces d'oiseaux en interaction avec l'un des vecteurs du VNO les plus importants au Québec, ainsi que pour mettre en évidence la présence d'un changement de préférences alimentaires en faveur des mammifères au cours de l'été. Dans ce qui suit, nous discutons brièvement des différentes sources de données ayant conduit à l'élaboration de cette liste, des résultats obtenus pour CPR avant de mettre l'accent sur les oiseaux d'intérêt.

Préférence alimentaire des moustiques

Préférences aviaires

Culex pipiens-restuans est un complexe de moustiques principalement ornithophiles (Gingrich et al. 2005). Notre étude le confirme avec 36% de l'échantillonnage connu des repas sanguins effectués sur des oiseaux et 5% effectués sur des mammifères. Les 59% restants ont été effectués sur des espèces non définies en raison d'une dégradation de l'ADN présent dans les échantillons sanguins. Parmi les espèces aviaires les plus piquées relativement à leur abondance, on trouve l'étourneau sansonnet, le merle d'Amérique et le jaseur d'Amérique. La paruline couronnée et l'épervier de Cooper font parti des espèces les moins utilisées par CPR. Si les études des repas sanguins effectuées en Amérique du Nord s'entendent sur le fait que la préférence de CPR va au merle d'Amérique (Apperson, Harrison et al. 2002, Kilpatrick, Kramer et al. 2006, Hamer, Kitron et al. 2009, Levine, Mead et al. 2016) ainsi qu'à l'étourneau sansonnet (Hamer, Kitron et al. 2009), les espèces d'oiseaux sur lesquelles CPR se nourrit préférentiellement comprennent le geai bleu, le cardinal rouge, le moineau domestique ou la tourterelle triste (Apperson, Harrison et al. 2002, Kilpatrick, Kramer et al. 2006, Hamer, Kitron et al. 2009, Levine, Mead et al. 2016), alors que dans notre étude, ces espèces sont évitées ou inexistantes (geai bleu). Bien que ces espèces soient

théoriquement présentes dans le sud du Québec, elles ne semblent pas être piquées par les moustiques collectés dans les pièges. Cela peut être dû au fait que l'emplacement des pièges à moustiques n'étaient pas situés dans des zones d'habitat favorables pour des espèces telles que le moqueur polyglotte ou le geai bleu. En effet, les pièges à moustiques sont généralement placés à proximité d'habitats résidentiels ou urbains alors que de nombreux oiseaux, dont le geai bleu et les oiseaux moqueurs, préfèrent un habitat moins urbanisé (Ringia, Blitvich et al. 2004, Kilpatrick, LaDeau et al. 2007).

Le cas du moineau domestique est plus nuancé. S'il est considéré comme une espèce pour laquelle CPR a un attrait dans la littérature (Hamer, Kitron et al. 2008, Levine, Mead et al. 2016), dans notre étude, l'indice de préférence d'hôte est à peine supérieure à 1 et semble avoir été piqué proportionnellement à son abondance.

De manière générale, les préférences alimentaires aviaires relevées dans notre étude sont confirmées par la littérature. Tel que supputé, on retrouve également bien le merle d'Amérique, considéré comme superpropagateur dans la littérature et repas préféré de CPR (Levine, Mead et al. 2016, Owen, Landwerlen et al. 2021), parmi les espèces les plus représentées dans les préférences alimentaires de CPR. La variabilité des résultats peut notamment s'expliquer par une différence liée au choix des sites de piègeage.

De même, la dynamique intra-saisonnière des espèces varie selon la latitude où se place l'étude. Notre étude, se situant la plus au nord, on peut s'attendre à ce que des espèces migratrices, par exemple, ne soient pas encore ou plus présentes au Québec au moment où les échantillons ont été collectés. De plus, même si notre échantillon demeure représentatif d'une manière générale vis-à-vis de ce qui a été constaté dans la littérature, 162 échantillons collectés n'ont pas pu être interprétés. S'il est fort probable que ces résultats auraient confirmé nos conclusions et apporté plus de robustesse aux résultats, il est aussi possible que certaines espèces auraient été davantage représentées dans les repas sanguins effectués par CPR.

Changement des préférences alimentaires

Bien qu'il soit ornithophile, *Culex pipiens-restuans* semble modifier ses préférences alimentaires au cours de la saison. Alors que sa préférence alimentaire concerne les oiseaux au début de la

saison (mai-juin), les ratio oiseaux / mammifères diminue ensuite entre juillet et septembre. En Amérique du Nord, de tels changements ont été également observés et résultent d'une diminution de l'abondance de merles d'Amérique (Kilpatrick, Kramer et al. 2006, Hamer, Kitron et al. 2009, Shahhosseini, Frederick et al. 2021), qui a également été constatée dans notre zone d'étude à partir des données EPOQ. Plutôt que se tourner vers une autre espèce d'oiseau, CPR privilégie les repas sanguins sur les mammifères. Ce changement apparent en faveur des mammifères est liée avec la période durant laquelle une épidémie de cas humains de VNO (Kilpatrick, Kramer et al. 2006, Hamer, Kitron et al. 2009). De tels changements ont aussi été constaté en Europe, mais dans le sens inverse, c'est-à-dire des mammifères vers les oiseaux en fin d'été (Brugman, Hernández-Triana et al. 2017)

D'autres changements dans les préférences alimentaires ont également été mis en évidence en Amérique du Nord mais entre espèces d'oiseaux. A Atlanta par exemple, il a été montré qu'au cours de l'été, durant la période principale de transmission du virus, les populations de moustiques changeaient d'espèce préférée entre le merle d'Amérique, vers le cardinal rouge, considéré comme « super-suppresseur » de l'épidémie en comparaison au caractère « super-propagateur » du merle d'Amérique (Levine, Mead et al. 2016).

On suppose que la variation de l'abondance des espèces et de la composition de la communauté des hôtes seraient responsables de ces changements. En effet, il a été observé qu'un changement d'espèce préféré serait directement lié à un changement significatif de l'abondance de certaines espèces privilégiées au cours de la saison .(Greenberg, DiMenna et al. 2012, Rizzoli, Bolzoni et al. 2015, Shahhosseini, Friedrich et al. 2018), comme le merle d'Amérique par exemple.

D'autres phénomènes de changements dans les préférences alimentaires ont été observé chez d'autres vecteurs et pour d'autres pathogènes : par exemple, en Argentine, il a été constaté que la préférence alimentaire du vecteur de la maladie de Chagass est en faveur des chiens ou des poulets plutôt que des humains quand ces espèces sont dans la chambre la nuit (Gurtler, Cohen et al. 1997), pour le vecteur de la Malaria au Kenya, la préférence en extérieur va des humains vers le bétail (Degefa, Yewhalaw et al. 2017).

Un tel phénomène peut avoir plusieurs conséquences. Un basculement vers les mammifères et les humains notamment peut entraîner une épidémie et devenir un problème de santé publique avec une recrudescence des cas humains, voir conduire à la mort d'individus. Un basculement vers une espèce moins compétente, telle que le cardinal rouge peut au contraire enrayer la notion d'épidémie. Le cardinal rouge étant moins compétent qu'une espèce comme le merle d'Amérique, la probabilité de retransmettre le virus à un autre moustique est beaucoup plus faible et cela entraîne une diminution de la propagation du virus dans une région donnée.

Liste des espèces d'oiseaux sauvages potentiellement impliquées dans le cycle épidémiologique du VNO dans la région de Montréal.

La liste présentée dans le tableau 5 est inédite pour l'Amérique du Nord et donc pour le Québec. À notre connaissance, une liste similaire a été réalisée pour la Camargue (sud-est de la France) (Jourdain, Toussaint et al. 2007). Notre liste contient 67 espèces d'oiseaux. Ces oiseaux appartiennent à différentes familles, différents ordres. Ils ont tous des profils très différents en termes d'exposition au virus du Nil occidental, qu'il s'agisse de la séroprévalence, de la mortalité, de la compétence de l'hôte, du statut migratoire ou de la zone de reproduction / hivernage et aucun indicateur n'est clairement prédictif d'un autre. Chacune des caractéristiques rapportées dans le tableau 5 peut fournir des informations sur le rôle possible de certaines espèces dans le cycle du virus du Nil occidental sans nous permettre d'énoncer clairement ce rôle et nous a permis d'établir un classement des espèces sur lesquelles la surveillance doit se diriger et de confirmer plusieurs hypothèses effectuées sur les espèces d'importance dans le cycle du VNO.

Cependant, les observations suivantes peuvent être faites.

Caractéristiques aviaires liées au VNO

Séroprévalence

Les espèces pour lesquelles la séroprévalence est la plus élevée (>51%) comprennent le moineau domestique, le cardinal rouge, le pigeon biset, la tourterelle triste et le merle d'Amérique. La variabilité de la séroprévalence dans le temps et dans l'espace ne permet pas de prédire si la séroprévalence d'une espèce donnée sera élevée ou non. Cependant, parmi ces espèces citées,

le pigeon biset, la tourterelle triste et le cardinal rouge présentent des compétences d'hôte faibles (<1), tandis que le merle d'Amérique et le moineau domestique présentent des compétences d'hôte élevées (>1). En d'autres termes, il est difficile de décrire une relation entre la compétence de l'hôte, la séroprévalence et la mortalité.

Fait intéressant, si nous étudions le groupe d'espèces de forte séroprévalence, celles-ci sont surtout résidentes et localisées dans la plus grande région possible (QC + N + S). En tant qu'espèces résidentes, on peut donc s'attendre à ce que leur séroprévalence élevée soit liée à une exposition locale permanente aux vecteurs et donc au virus. Les oiseaux migrateurs quant à eux traversent les zones d'activité virale, maintenues par les oiseaux résidents, durant leur migration et sont ainsi exposés au virus (Komar, Langevin et al. 2003, Crans 2004). On s'attend ainsi à ce que les espèces migratrices à forte séroprévalence introduisent le virus dans de nouvelles zones et sur de longues distances au cours de leur migration (McLean 2006).

Mortalité aviaire

On distingue clairement deux vagues épidémiques dans la surveillance passive des oiseaux morts effectuée par le CWHC : 2001-2008 d'une part et 2009-2017 d'autre part. Durant la première vague, les oiseaux morts signalés positifs au VNO sont principalement la corneille d'Amérique et le geai bleu, toutes deux espèces appartenant à la famille des Corvidés. Au cours de la deuxième vague, la diversité parmi les espèces mortes trouvées positives pour le virus du Nil occidental a considérablement augmenté, avec 18 espèces différentes parmi lesquelles on retrouve à nouveau une grande proportion de Corvidés (geais bleus et de corneille d'Amérique) mais aussi Accipitridés, des Strigidés et des Falconidés. Ces observations se retrouvent dans ce qui est proposé dans la littérature. En effet, la corneille d'Amérique et le geai bleu ont été considérés comme un indicateur de la circulation du virus au début des épidémies (Ludwig, Bigras-Poulin et al. 2010, Foppa, Beard et al. 2011). Bien qu'ils soient un bon indicateur, les deux espèces ont une virémie élevée lorsqu'elles sont infectées (Komar, Langevin et al. 2003) mais n'ont peut-être pas joué un rôle clé dans l'amplification du virus en raison du taux de mortalité élevé associé à l'infection virale au début de la présence du virus sur le continent. Contrairement au roselin

famillier, espèce privilégiée pour l'amplification du VNO en Californie, avec *Culex tarsalis* comme espèce vectrice principale (Worwa, Hutton et al. 2019), qui présente une compétence d'hôte élevée et une absence de données de mortalité.

Les données issues de la surveillance passive du CWHC montrent une évolution de la sensibilité des espèces au virus depuis 2002. Si lors de la première vague épidémique, les cas d'oiseaux morts testés au VNO provenaient exclusivement de Corvidés, on trouve depuis la deuxième vague (2009), d'autres espèces appartenant à des espèces migratrices migratrices pour la plupart dont l'aire de répartition s'étend jusqu'au sud des États-Unis et au nord du Mexique.

Pour expliquer ces variations de la mortalité, nous pourrions émettre une hypothèse selon laquelle la réponse immunitaire des oiseaux au VNO a évolué depuis 1999. Au cours de la première vague épidémique, la souche introduite en 1999 aux États-Unis était l'une des plus virulentes du lignage 1, à cela s'ajoute le fait que les oiseaux étaient très sensibles, certainement en raison de leur naïveté immunologique (Ritchie 1995), contrairement à la deuxième vague. Plus récemment, la littérature a montré que des hôtes tels que les oiseaux peuvent développer une réponse immunitaire passive, une forme d'activation immunitaire rapide, comme l'immunité innée, qui leur confère une protection à long terme (sur plusieurs saisons) contre le VNO (Ahlers and Goodman 2018). On sait peu de choses sur l'évolution spécifique de la réponse immunologique de la corneille d'Amérique et du geai bleu au VNO depuis 2000, mais des observations ont été faites sur les moineaux domestiques (Nemeth, Young et al. 2009) et les espèces de rapaces (Nemeth, Kratz et al. 2008). Ce phénomène est d'autant plus important que des individus immunisés peuvent également le transmettre à leur progéniture. Des anticorps maternels anti-VNO ont été mesurés chez de jeunes flamands roses (Baitchman, Tlusty et al. 2007), des petits-ducs maculés (Hahn, Nemeth et al. 2006) et des pigeons bisets (Gibbs, Hoffman et al. 2005). D'autres études ont également montré qu'une immunisation contre un flavivirus pourrait conférer une immunisation contre un autre virus de cette famille. Ainsi, les roselins familiers immunisés initialement contre le virus de l'encéphalite de Saint-Louis (SLEV) l'étaient également contre le VNO (Fang and Reisen 2006). Cela montre que l'adaptation du système immunitaire par les oiseaux est une possibilité évidente, dans un intervalle de temps de la durée de la circulation du virus West Nile dans notre région d'étude (environ 15 ans).

Migration des espèces aviaires

La majorité des espèces d'oiseaux (62%) de notre liste sont à la fois migratrices et résidentes et présentent, en plus, une compétence d'hôte élevée (>1). Les autres espèces compétentes sont résidentes. Aucune n'est strictement migratrice. Cela diffère du profil global de nos espèces où l'on a 38% d'espèces migratrices, 20% d'espèces résidentes et 42% d'espèces à la fois résidentes et migratrices et où on aurait pu s'attendre à ce que les proportions d'espèces compétentes soient proportionnelles à chaque groupe d'espèces selon leur profil migrateur. Parmi les espèces à forte mortalité, 21% sont strictement résidentes et les 79% restant sont à la fois résidentes et migratrices. Une espèce migratrice semble plus exposée au VNO qu'une espèce résidente parce qu'elle traverse les zones d'activité virale, maintenues par les oiseaux résidents, durant sa migration et est ainsi exposée au virus (Komar, Langevin et al. 2003, Crans 2004).

L'hypothèse du lien entre la portée géographique du mouvement des oiseaux et la propagation du VNO a été explorée dans plusieurs études. Aux États-Unis, le lien entre la progression du VNO dans une zone (nord ou sud) et le mouvement des oiseaux migrateurs dans les corridors atlantiques et centraux des États-Unis a été mis en évidence. Il montre que la boucle faite par les oiseaux migrateurs est en corrélation avec les zones d'activité du virus et que l'état de l'Illinois est une zone clé puisqu'il est commun aux routes de migration de l'Atlantique et du Mississippi (Swetnam, Widen et al. 2018). En France, des études ont mis en évidence le rôle de l'oiseau migrateur en tant qu'introducteur du virus, en particulier lors de l'épizootie de 2000 dans le sud de la France (Durand, Chevalier et al. 2002). Une liste de 122 espèces d'oiseaux migrateurs potentiellement introduites par le VNO a été établie. Elle était basée sur le type d'habitat (zone humide), la région d'origine des oiseaux et la période de présence sur le site à l'étude (Jourdain, Toussaint et al. 2007). Des études de séroprévalence ultérieures ont été utilisées pour détecter les anticorps anti-VNO chez 9 espèces d'oiseaux migrateurs de longue distance du sud du Sahara et 2 espèces de migrateurs de courte distance (héron-garde-corps et canard colvert) (Jourdain, Zeller et al. 2008). Ce lien établi entre la portée géographique des oiseaux migrateurs et le VNO

pourrait ainsi venir corroborer notre hypothèse que le virus est ramené chaque année au Québec par les espèces migratrices arrivant du sud.

On constate également que les espèces ayant une compétence d'hôte élevée (>1) hivernent et se reproduisent de manière stricte dans la région QC + N + S (sauf le pigeon biset qui se reproduit dans la région QC + N). QC + N + S représente la zone du corridor migratoire de l'Atlantique Est avec QC, la section du Québec, N, la section Nord des États-Unis (entre le Maine et la Virginie) et S, la section Sud des États-Unis (entre la Caroline du Nord et la Floride). Nous pouvons donc également nous attendre à ce que les espèces hautement compétentes soient plus exposées aux agents pathogènes (y compris le VNO), car elles visitent fréquemment de plus grandes zones pendant la saison d'hivernage et de reproduction. En outre, parmi les espèces à forte mortalité, la plupart ont de grandes zones d'hivernage et de reproduction (parmi le groupe de 67 espèces). À nouveau, il semble qu'elles soient davantage exposées au VNO en raison d'une circulation plus importante des individus. En effet, selon les données d'ArboNET, le système américain de surveillance des arboviraux (CDC 2019), des cas de VNO chez des oiseaux ont été recensés dans plusieurs États américains : le centre et l'est du pays, puis vers l'ouest et particulièrement vers le sud-ouest et le centre-est. Des cas sont principalement enregistrés dans le sud-ouest (Californie) et le nord-est (New York, Illinois, Pennsylvanie) principalement. Mais peu de cas sont enregistrés dans le sud-est.

Espèces d'oiseaux potentiellement candidates à l'amplification du VNO

Le concept de compétence de l'hôte développé par Nicholas Komar nous a permis d'affiner notre liste de 67 espèces en un groupe plus restreint d'espèces d'oiseaux pouvant jouer un rôle plus important dans l'amplification du VNO. La compétence de l'hôte est développée autour de l'idée d'avoir un oiseau capable de transmettre le virus à un autre moustique susceptible (Komar, Langevin et al. 2003).

Le premier critère sur lequel on se base pour sélectionner une bonne espèce candidate à l'amplification du VNO dans notre zone d'étude est que la ou les espèces doivent être

compétentes (donc présenter une compétence d'hôte >1). Parmi les 8 espèces sélectionnées, on a (des plus compétents aux moins compétents) : le geai bleu, le quiscale bronzé, le roselin familier, le moineau domestique, le bruant chanteur, le merle d'Amérique, la corneille d'Amérique et le goéland à bec cerclé. Ces espèces sont réparties en 7 familles : Corvidae (y compris les espèces ayant les compétences les plus élevées comme le geai bleu), Laridae, Turdidae, Passerellidae, Passeridae, Icteridae et Fringillidae.

Être un hôte compétent pour l'amplification du VNO dans notre région d'étude signifie : être sensible au virus, mais pas trop ; et être abondant, en particulier dans la région où se trouve le principal vecteur moustique (Worwa, Hutton et al. 2019). Suivant ces critères, nous pourrions émettre l'hypothèse que le geai bleu, le quiscale bronzé, le moineau domestique, le merle d'Amérique pourraient jouer ces rôles. Le roselin familier, le goéland à bec cerclé et le bruant chanteur en raison de leur habitat moins urbanisé et plus spécifique ne peuvent pas jouer ce rôle d'oiseau amplificateur pour la région de Montréal. Pour être un bon amplificateur, il ne faut pas que l'espèce candidate soit sensible au VNO et présente des taux élevés de mortalité. Ceci recadre donc le geai bleu et la corneille d'Amérique. En croisant ces observations avec nos résultats des données sur le repas sanguin, nous pouvons affiner la liste de 5 à 2 espèces principales : le merle d'Amérique et le moineau domestique.

Il faut cependant être prudent : cette conclusion n'exclue pas que d'autres espèces d'oiseaux jouent un rôle dans la transmission du VNO. Il s'agit ici d'évaluer le processus d'amplification du virus intra-saisonnier et nous n'explorons pas, par exemple, les espèces d'oiseaux possibles impliquées plus strictement dans la transmission du virus de la migration chaque printemps.

Limites

Incontestablement, cette étude présente certaines limites.

Taux de mortalité aviaire

Si les données ont été segregées spatialement, pour représenter notre zone d'étude réelle, le taux de mortalité aviaire par espèces est calculé sur la base des carcasses d'oiseaux trouvées dans

la nature. Ceci donne un indicateur, mais n'est pas relatif à la densité réelle d'une population donnée.

Cette surveillance passive coordonnée par le CWHC au Canada, repose sur une démarche citoyenne et le signalement de la présence d'une carcasse à un endroit donné par un volontaire. On s'attend donc à ce que l'échantillonnage soit plus important dans une zone de grande concentration de la population par rapport à une zone rurale, ce qui aura tendance à biaiser les résultats. De plus, après des campagnes de promotion de la surveillance passive, il a été constaté une baisse de l'engouement de la population pour ces questions là et que le nombre de carcasses signalées diminuent au fil des années (CWHC 2016).

On note également qu'au début de la mise en place de cette surveillance passive durant la première vague épidémique, l'accent a été mis sur les corvidés tels que la corneille d'Amérique et le geai bleu, ciblant davantage les recherches. Des familles d'espèces, en revanche, telles que les strigidés et accipitridae, font l'objet d'une surveillance accrue et sont systématiquement testées pour le VNO lors d'un passage en centre d'habilitation (CWHC 2016). Aujourd'hui, et depuis la deuxième vague, une plus grande diversité des espèces a été observée. On peut donc s'interroger si l'échantillonnage est réellement représentatif. De plus, il arrive que des espèces ne soient jamais échantillonnées en raison de leur petite taille ou de caractéristiques morphologiques attrayants pour des prédateurs, avant même que leur carcasse ne soit signalée.

Hormis la différence spatiale de l'échantillonnage entre les zones denses et celles plus rurales, on peut s'attendre à une différence dans l'échantillonnage au niveau temporel avec plus de temps le weekend par exemple, pour faire la démarche de signalements aux autorités compétentes.

Revue de littérature sur la séroprévalence et la compétence d'hôte des réservoirs du VNO

Cette revue de littérature présente plusieurs limites pour lesquelles il est difficile de passer outre. En effet, concernant les données de séroprévalence, aucune étude similaire n'a été effectuée pour le sud du Québec à grande échelle, hormis pour les faucons crécerelle (Dubé, Bird et al. 2010). De ce fait, le choix a été fait dans un premier temps de rechercher des données en

provenance de régions du nord-est des États-Unis, dont la situation semble similaire (mêmes vecteurs, mêmes espèces d'oiseaux, conditions météorologiques similaires) et de l'extrapoler à notre région d'étude. Cette recherche a ensuite été étendue aux régions situées sur le couloir migratoire de l'Atlantique Est, en raison de la présence d'espèces migratrices revenant vers le Québec. Si les états du nord-est avaient des conditions assez similaires à celles du sud du Québec. Ce n'est pas le cas des états situés à des latitudes plus au sud. On peut donc s'interroger sur la représentativité des données provenant de ces régions là.

On constate également une grande variabilité inter- et intra-espèces selon les données relevées dans les diverses publications. Effectivement, un large échantillon pour une espèce donnée apportera toujours une information plus robuste quant à la séroprévalence de cette espèce, mais comment conclure à partir d'une séroprévalence de 0% ou de 100% obtenue à partir d'un unique individu ?

Il a été noté précédemment que la séroprévalence pouvait varier dans le temps. Cette séroprévalence a donc aussi pu évoluer dans le temps entre la première vague épidémique, où les oiseaux étaient immunologiquement naïfs, et aujourd'hui. Pour s'affranchir de cela, nous aurions pu cibler uniquement les études de séroprévalences effectuées à partir de la deuxième vague épidémique.

Concernant les études de compétences d'hôtes, bien que toujours largement utilisées dans les publications sur le sujet, celles-ci sont rares (3), sont anciennes et ont été faites en laboratoire. Il serait important de pouvoir s'appuyer sur de nouvelles données plus récentes afin de d'avoir une meilleure idée des valeurs réelles de compétences d'hôte.

Estimations locales de la densité des oiseaux

Comme pour le taux de mortalité aviaire, les données ont été ségréguées spatialement et représentent notre zone d'étude réelle. Les estimations locales de la densité des oiseaux sont obtenues à partir de la plateforme ebird, qui s'appuie sur la contribution citoyenne, fait autorité en Amérique du Nord et constitue le meilleur moyen d'obtenir des données de recensement des espèces aviaires dans une région donnée (Sullivan, Wood et al. 2009, Zhang 2020).

Malgré le grand nombre d'observations et d'ornithologistes amateurs alimentant chaque jour la plateforme, l'échantillonnage reste biaisé dans le temps et l'espace et dépend de l'endroit où et quand les ornithologistes effectuent leurs observations : ainsi des zones proches d'une plus grande concentration de la population ou facilement accessibles sont davantage échantillonnées et l'échantillonnage est plus intensif le weekend ou en période de vacances (Zhang 2020).

De plus, en raison de la présence de plusieurs observateurs au même moment, la présence d'une espèce dans une zone donnée peut être surestimée. De même, une espèce plus caractéristique qu'une autre, plus facile à identifier peut être surestimée relativement à la diversité des espèces présente dans cette même zone.

Donnée de l'étude effectuée sur les repas sanguins

La taille de l'échantillon pour l'étude des repas de sanguins présente une limite. En effet, sur 273 échantillons de moustiques recueillis, seuls 111 ont été séquencés (97 séquencés avec des amorces aviaires). Ceci est dû à la qualité des échantillons et à la dégradation de l'ADN présent dans les échantillons de moustiques. Par conséquent, nous ne pouvons avoir qu'une idée de la préférence alimentaire des moustiques Culex, corroborée par ce que l'on peut trouver dans la littérature.

On peut également s'interroger du choix des pièges. 273 femelles CPR est un échantillon de petite taille pour une collecte effectuée entre 2008 et 2014. Il semble que ceci n'ait pas été spécifique aux femelles gravides.

Création de la liste d'espèces potentiellement impliquées dans le cycle du VNO au Québec

Notre liste d'espèces potentiellement impliquées dans le cycle du VNO présente une utilisation combinée de plusieurs bases de données avec chacune ses limites. Lorsqu'on observe le tableau 3, beaucoup d'espèces présentent des données incomplètes, parce qu'elles ne sont pas retrouvées dans les 4 sources de données. De ce fait, il est plus difficile d'effectuer une

comparaison. Cela rend notre comparaison et notre exploration des rôles possibles des espèces d'oiseaux dans la transmission du VNO plus complexes.

Conclusion

Ce travail inédit pour le Québec et plus généralement pour l'Amérique du Nord a montré plusieurs choses et pu confirmer certaines hypothèses.

Nous avons une meilleure connaissance des espèces d'oiseaux dont se nourrit *Culex pipiens-restuans*, la principale espèce de moustique impliquée dans la transmission du virus WN dans le sud du Québec. Ce sont principalement ces espèces qui peuvent acquérir le virus et le disperser dans la région. Mais toutes les espèces d'oiseaux ne sont pas égales dans leur rôle dans le cycle épidémiologique. Nous avons également confirmé la présence d'un changement dans les préférences alimentaires de CPR des oiseaux vers les mammifères au cours de l'été et ainsi justifier la recrudescence de VNO chez les humains au cours de l'été, plutôt qu'au début.

La liste finale des espèces candidates à l'amplification du virus indique les espèces compétentes pour la propagation du virus, les espèces sensibles au virus et pouvant constituer un bon indicateur de sa présence. Nous avons ainsi pu confirmer notre hypothèse que le merle d'Amérique est un bon candidat pour l'amplification du virus, de même que le moineau domestique. Ainsi que l'importance de continuer la surveillance de la corneille d'Amérique et du geai bleu en tant qu'indicateur de la présence du virus dans une région donnée. Cette liste de 67 espèces ainsi que les caractéristiques décrites, ont également permis de venir corroborer notre hypothèse que le virus est ramené chaque année au Québec par les espèces migratrices arrivant du sud, et que les espèces résidentes (ici le merle d'Amérique et le moineau domestique) sont là pour amplifier le virus localement.

Malheureusement, toutes les espèces pour lesquelles nous disposons de données sur le repas sanguin n'ont pas de compétence d'hôte connue, ce qui rend notre conclusion plus complexe. Il est essentiel d'améliorer le nombre d'études liées à la détermination de la compétence des espèces d'oiseaux pour le virus du Nil occidental en particulier, mais aussi pour les maladies

transmises par les moustiques en général, afin de bien comprendre le mécanisme qui sous-tend la circulation et l'amplification des maladies. Le rôle général des oiseaux dans la transmission des maladies est bien établi pour de nombreuses maladies. Dans un contexte de changements climatiques et environnementaux, ces informations de base sont essentielles pour déterminer la période durant laquelle le risque d'avoir le VNO est la plus élevée et les zones de haut risque ou de mieux déterminer comment et pas quelles espèces le VNO est réintroduit au Québec au printemps. Enfin cette liste donne une bonne idée des espèces sur lesquelles une surveillance accrue pourrait être mise en place et sur lesquelles, pourquoi pas, cibler une vaccination future quand celle-ci sera possible (Jiménez de Oya, Escribano-Romero et al. 2019).

Références bibliographiques

- Abbasi, I., R. Cunio and A. Warburg (2009). "Identification of blood meals imbibed by phlebotomine sand flies using cytochrome b PCR and reverse line blotting." Vector Borne Zoonotic Dis **9**(1): 79-86.
- Ahlers, L. R. and A. G. Goodman (2018). "The immune responses of the animal hosts of West Nile virus: a comparison of insects, birds, and mammals." Frontiers in cellular and infection microbiology **8**: 96.
- Alcaide, M., C. Rico, S. Ruiz, R. Soriguer, J. Muñoz and J. Figuerola (2009). "Disentangling vector-borne transmission networks: a universal DNA barcoding method to identify vertebrate hosts from arthropod bloodmeals." PloS one **4**(9): e7092-e7092.
- Amos, B. A. and R. T. Cardé (2020). "Efficiency of CO₂-baited CDC miniature light traps under semi-field conditions and characterizing response behaviors of female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)." Journal of Vector Ecology **45**(2): 180-187.
- Anaguano, D. F., P. Ponce, M. E. Baldeón, S. Santander and V. Cevallos (2015). "Blood-meal identification in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from Valle Hermoso, a high prevalence zone for cutaneous leishmaniasis in Ecuador." Acta Trop **152**: 116-120.
- Apperson, C. S., B. A. Harrison, T. R. Unnasch, H. K. Hassan, W. S. Irby, H. M. Savage, S. E. Aspen, D. W. Watson, L. M. Rueda, B. R. Engber and R. S. Nasci (2002). "Host-feeding habits of *Culex* and other mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the Borough of Queens in New York City, with characters and techniques for identification of *Culex* mosquitoes." Journal of Medical Entomology **39**(5): 777-785.
- Apperson, C. S., H. K. Hassan, B. A. Harrison, H. M. Savage, S. E. Aspen, A. Farajollahi, W. Crans, T. J. Daniels, R. C. Falco, M. Benedict, M. Anderson, L. McMillen and T. R. Unnasch (2004). "Host feeding patterns of established and potential mosquito vectors of West Nile virus in the eastern United States." Vector Borne Zoonotic Dis **4**(1): 71-82.
- ASPC. (2012-2020). "West Nile virus and other mosquito-borne diseases national surveillance report." from <https://www.canada.ca/en/public-health/services/diseases/west-nile-virus/west-nile-virus-other-mosquito-borne-disease.html>.
- Aydin, S. (2015). "A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA." Peptides **72**: 4-15.
- Baitchman, E. J., M. F. Tlusty and H. W. Murphy (2007). "J Zoo Wildl Med.: Passive transfer of maternal antibodies to West Nile virus in flamingo chicks (*Phoenicopterus chilensis* and *Phoenicopterus ruber ruber*)." Journal of Avian Medicine and Surgery **21**: 327.
- Baitchman, E. J., M. F. Tlusty and H. W. Murphy (2007). "Passive transfer of maternal antibodies to West Nile virus in flamingo chicks (*Phoenicopterus chilensis* and *Phoenicopterus ruber ruber*)." J Zoo Wildl Med **38**(2): 337-340.

- Balança, G., N. Gaidet, G. Savini, B. Vollet, A. Foucart, P. Reiter, A. Boutonnier, R. Lelli and F. Monicat (2009). "Low West Nile virus circulation in wild birds in an area of recurring outbreaks in Southern France." Vector Borne Zoonotic Dis **9**(6): 737-741.
- Balenghien, T., F. Fouque, P. Sabatier and D. J. Bicout (2011). "Theoretical formulation for mosquito host-feeding patterns: application to a West Nile virus focus of southern France." J Med Entomol **48**(5): 1076-1090.
- Barrett, A. D. T. (2018). "West Nile in Europe: an increasing public health problem." Journal of Travel Medicine **25**(1).
- Baum, M., E. A. de Castro, M. C. Pinto, T. M. Goulart, W. Baura, R. Klisiowicz Ddo and M. C. Vieira da Costa-Ribeiro (2015). "Molecular detection of the blood meal source of sand flies (Diptera: Psychodidae) in a transmission area of American cutaneous leishmaniasis, Paraná State, Brazil." Acta Trop **143**: 8-12.
- Bhattacharya, S., P. Basu and C. Sajal Bhattacharya (2016). "The southern house mosquito, *Culex quinquefasciatus*: profile of a smart vector." J Entomol Zool Stud **4**(2): 73-81.
- Bicout, D. J. (2013). Le virus du Nil occidental.
- Boisvert, M. (2005). Relevé des gîtes à *Culex* en milieu urbain. Projet de recherche réalisé dans le cadre de l'étude d'impact sur l'environnement du programme de pulvérisations aériennes d'insecticides pour contrer le virus du Nil occidental en cas d'épidémie., INSPQ.
- Bolduc, D., R. Côté, M. Douville-Fradet, L. Lambert and L. Pinsonneault (2006). "Le risque relié au virus du Nil occidental et les interventions à privilégier." Institut national de santé publique du Québec, Québec, Canada: 34.
- Borland, E. M. and R. C. Kading (2021). "Modernizing the Toolkit for Arthropod Bloodmeal Identification." Insects **12**(1): 37.
- Börstler, J., H. Jöst, R. Garms, A. Krüger, E. Tannich, N. Becker, J. Schmidt-Chanasit and R. Lühken (2016). "Host-feeding patterns of mosquito species in Germany." Parasites & Vectors **9**(1): 318.
- Bourassa, J.-P. (2000). Le moustique : par solidarité écologique. Montréal, Boréal.
- Brady, O. J., H. C. J. Godfray, A. J. Tatem, P. W. Gething, J. M. Cohen, F. E. McKenzie, T. A. Perkins, R. C. Reiner, L. S. Tusting, M. E. Sinka, C. L. Moyes, P. A. Eckhoff, T. W. Scott, S. W. Lindsay, S. I. Hay and D. L. Smith (2016). "Vectorial capacity and vector control: reconsidering sensitivity to parameters for malaria elimination." Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **110**(2): 107-117.
- Brinton, M. A. (2013). "Replication cycle and molecular biology of the West Nile virus." Viruses **6**(1): 13-53.
- Bronson, E., H. Spiker and C. P. Driscoll (2014). "Serosurvey for selected pathogens in free-ranging American black bears (*Ursus americanus*) in Maryland, USA." Journal of wildlife diseases **50**(4): 829-836.
- Brugman, V. A., L. M. Hernández-Triana, M. E. England, J. M. Medlock, P. P. C. Mertens, J. G. Logan, A. J. Wilson, A. R. Fooks, N. Johnson and S. Carpenter (2017). "Blood-feeding patterns of

native mosquitoes and insights into their potential role as pathogen vectors in the Thames estuary region of the United Kingdom." Parasites & Vectors **10**(1): 163.

Brugman, V. A., L. M. Hernández-Triana, J. M. Medlock, A. R. Fooks, S. Carpenter and N. Johnson (2018). "The Role of *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) in Virus Transmission in Europe." International Journal of Environmental Research and Public Health **15**(2): 389.

Brugman, V. A., L. M. Hernández-Triana, S. W. J. Prosser, C. Weland, D. G. Westcott, A. R. Fooks and N. Johnson (2015). "Molecular species identification, host preference and detection of myxoma virus in the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) in southern England, UK." Parasites & vectors **8**: 421-421.

Bueno-Marí, R. and R. Jiménez-Peydró (2011). "Classification of Spanish Mosquitoes in Functional Groups." Journal of the American Mosquito Control Association **27**(1): 1-7, 7.

Burkhalter, K. L. and H. M. Savage (2015). "Evaluating the Use of Commercial West Nile Virus Antigens as Positive Controls in the Rapid Analyte Measurement Platform West Nile Virus Assay." Journal of the American Mosquito Control Association **31**(4): 371-374.

Calhoun, L. M., M. Avery, L. Jones, K. Gunarto, R. King, J. Roberts and T. R. Burkot (2007). "Combined sewage overflows (CSO) are major urban breeding sites for *Culex quinquefasciatus* in Atlanta, Georgia." Am J Trop Med Hyg **77**(3): 478-484.

Campbell, G., R. Lanciotti, B. Bernard and H. Lu (2002). "Laboratory-acquired West Nile virus infections - United States, 2002." Morbidity and Mortality Weekly Report **51**(50): 1133-1135.

Campbell, G. L., A. A. Marfin, R. S. Lanciotti and D. J. Gubler (2002). "West Nile virus." Lancet Infectious Diseases **2**(9): 519-529.

Carpenter, S. J. and W. J. LaCasse (1955). Mosquitoes of North America (north of Mexico). Berkeley, Los Angeles, London, University of California Press.

Caviedes-Solis, I. W. and A. Nieto-Montes de Oca (2018). "A multilocus phylogeny of the genus *Sarcohyla* (Anura: Hylidae), and an investigation of species boundaries using statistical species delimitation." Mol Phylogenet Evol **118**: 184-193.

CDC.gov. (2018). "West Nile Virus Transmission Cycle." from https://www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/13_240124_west_nile_lifecycle_birds_plainlanguage_508.pdf.

Chancey, C., A. Grinev, E. Volkova and M. Rios (2015). "The global ecology and epidemiology of West Nile virus." BioMed research international **2015**: 376230-376230.

Charrel, R. N., A. C. Brault, P. Gallian, J. J. Lemasson, B. Murgue, S. Murri, B. Pastorino, H. Zeller, R. de Chesse, P. de Micco and X. de Lamballerie (2003). "Evolutionary relationship between Old World West Nile virus strains. Evidence for viral gene flow between Africa, the Middle East, and Europe." Virology **315**(2): 381-388.

Chen, C. C., E. Jenkins, T. Epp, C. Waldner, P. S. Curry and C. Soos (2013). "Climate change and West Nile virus in a highly endemic region of North America." International journal of environmental research and public health **10**(7): 3052-3071.

- Chuang, T. W., R. G. Knepper, W. W. Stanuszek, E. D. Walker and M. L. Wilson (2011). "Temporal and spatial patterns of West Nile virus transmission in Saginaw County, Michigan, 2003-2006." J Med Entomol **48**(5): 1047-1056.
- Ciota, A. T., D. J. Ehrbar, A. C. Matarachiero, G. A. Van Slyke and L. D. Kramer (2013). "The evolution of virulence of West Nile virus in a mosquito vector: implications for arbovirus adaptation and evolution." BMC Evol Biol **13**: 71.
- Collini, M., F. Albonico, H. C. Hauffe and M. Mortarino (2015). "Identifying the last bloodmeal of questing sheep tick nymphs (*Ixodes ricinus* L.) using high resolution melting analysis." Vet Parasitol **210**(3-4): 194-205.
- Colpitts, T. M., M. J. Conway, R. R. Montgomery and E. Fikrig (2012). "West Nile Virus: biology, transmission, and human infection." Clinical microbiology reviews **25**(4): 635-648.
- Coon, C. A., A. J. Brace, S. R. McWilliams, M. D. McCue and L. B. Martin (2014). "Introduced and native congeners use different resource allocation strategies to maintain performance during infection." Physiological and Biochemical Zoology **87**(4): 559-567.
- Crans, W. J. (2004). "A classification system for mosquito life cycles: life cycle types for mosquitoes of the northeastern United States." J Vector Ecol **29**(1): 1-10.
- Curler, G. R., J. K. Moulton and R. I. Madriz (2015). "Redescription of *Aposycorax chilensis* (Tonnoir) (Diptera, Psychodidae, Sycoracinae) with the first identification of a blood meal host for the species." Zootaxa **4048**(1): 114-126.
- Curry, P. S., C. Ribble, W. C. Sears, W. Hutchins, K. Orsel, D. Godson, R. Lindsay, A. Dibernardo and S. J. Kutz (2014). "Blood collected on filter paper for wildlife serology: detecting antibodies to *Neospora caninum*, West Nile virus, and five bovine viruses in reindeer." Journal of wildlife diseases **50**(2): 297-307.
- CWHC. (2016). "Le Virus du Nil Occidental." from http://fr.cwhc-rcsf.ca/west_nile_virus.php.
- Darsie, R. F., R. A. Ward, T. Litwak and C. C. Chang (2005). Identification and Geographical Distribution of the Mosquitos of North America, North of Mexico, University Press of Florida.
- Dauphin, G., S. Zientara, H. Zeller and B. Murgue (2004). "West Nile: worldwide current situation in animals and humans." Comp Immunol Microbiol Infect Dis **27**(5): 343-355.
- Degefa, T., D. Yewhalaw, G. Zhou, M.-c. Lee, H. Atieli, A. K. Githeko and G. Yan (2017). "Indoor and outdoor malaria vector surveillance in western Kenya: implications for better understanding of residual transmission." Malaria Journal **16**(1): 443.
- Dessureault, F. (2014). Disease States, Other Than West Nile Virus Infection, in American Crows (*Corvus brachyrhynchos*) Found Dead in Ontario.
- Direction de la vige sanitaire and MSSS. (2019). "Résultats annuels de surveillance intégrée du VNO et des autres arbovirus - Année 2019." from <https://www.inspq.qc.ca/zoonoses/vno/surveillance>.
- Dobson, A. and J. Foufopoulos (2001). "Emerging infectious pathogens of wildlife." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **356**(1411): 1001-1012.

- Doda, J. N., C. T. Wright and D. A. Clayton (1981). "Elongation of displacement-loop strands in human and mouse mitochondrial DNA is arrested near specific template sequences." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **78**(10): 6116-6120.
- Drebot, M. A., R. Lindsay, I. K. Barker, P. A. Buck, M. Fearon, F. Hunter, P. Sockett and H. Artsob (2003). "West Nile virus surveillance and diagnostics: A Canadian perspective." Can J Infect Dis **14**(2): 105-114.
- Dubé, M. C., D. M. Bird, A. Dibernardo, L. R. Lindsay and H. Charest (2010). "Prevalence of West Nile Virus in Wild American Kestrels (*Falco sparverius*) of Southern Quebec, Canada." Journal of Wildlife Diseases **46**(2): 603-607.
- Dufour, B. and P. Hendrickx (2011). Surveillance épidémiologique en santé animale: 3e édition, Quae.
- Dunn, E., J. Larivée and A. Cyr (2001). "Site specific observation in the breeding season improves the ability of checklist data to track population trends." Journal of Field Ornithology **72**: 547-555.
- Dunn, E. H., J. Larivée and A. Cyr (1996). "Can Checklist Programs Be Used to Monitor Populations of Birds Recorded during the Migration Season?" The Wilson Bulletin **108**(3): 540-549.
- Durand, B., V. Chevalier, R. Pouillot, J. Labie, I. Marendat, B. Murgue, H. Zeller and S. Zientara (2002). "West Nile virus outbreak in horses, southern France, 2000: results of a serosurvey." Emerging infectious diseases **8**(8): 777-782.
- Dusek, R. J., R. G. McLean, L. D. Kramer, S. R. Ubico, A. P. Dupuis, 2nd, G. D. Ebel and S. C. Guptill (2009). "Prevalence of West Nile virus in migratory birds during spring and fall migration." Am J Trop Med Hyg **81**(6): 1151-1158.
- Dusek, R. J., R. G. McLean, L. D. Kramer, S. R. Ubico, A. P. Dupuis, II, G. D. Ebel and S. C. Guptill (2009). "Prevalence of West Nile virus in migratory birds during spring and fall migration." American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **81**(6): 1151-1158.
- Ebel, G. D., J. Carricaburu, D. Young, K. A. Bernard and L. D. Kramer (2004). "Genetic and phenotypic variation of West Nile virus in New York, 2000–2003." The American journal of tropical medicine and hygiene **71**(4): 493-500.
- Ebel, G. D., I. Rochlin, J. Longacker and L. D. Kramer (2005). "Culex restuans (Diptera: Culicidae) Relative Abundance and Vector Competence for West Nile Virus." Journal of Medical Entomology **42**(5): 838-843.
- Elizondo-Quiroga, D. and A. Elizondo-Quiroga (2013). "West nile virus and its theories, a big puzzle in Mexico and latin america." Journal of global infectious diseases **5**(4): 168-175.
- Emord, D. E. and C. D. Morris (1984). "Epizootiology of eastern equine encephalomyelitis virus in upstate New York, USA. VI. Antibody prevalence in wild birds during an interepizootic period." J Med Entomol **21**(4): 395-404.

- Fang, Y. and W. K. Reisen (2006). "Previous infection with West Nile or St. Louis encephalitis viruses provides cross protection during reinfection in house finches." Am J Trop Med Hyg **75**(3): 480-485.
- Farajollahi, A., R. Gates, W. Crans and N. Komar (2004). "Serologic evidence of West Nile virus and St. Louis encephalitis virus infections in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) from New Jersey, 2001." Vector-Borne & Zoonotic Diseases **4**(4): 379-383.
- Farajollahi, A., N. A. Panella, P. Carr, W. Crans, K. Burgess and N. Komar (2003). "Serologic evidence of West Nile virus infection in black bears (*Ursus americanus*) from New Jersey." Journal of wildlife diseases **39**(4): 894-896.
- Fish, J., N. Raule and G. Attardi (2004). "Discovery of a major D-loop replication origin reveals two modes of human mtDNA synthesis." Science **306**(5704): 2098-2101.
- Fonseca, D. M., N. Keyghobadi, C. A. Malcolm, C. Mehmet, F. Schaffner, M. Mogi, R. C. Fleischer and R. C. Wilkerson (2004). "Emerging vectors in the *Culex pipiens* complex." Science **303**(5663): 1535-1538.
- Foppa, I. M., R. H. Beard and I. H. Mendenhall (2011). "The impact of West Nile virus on the abundance of selected North American birds." BMC Vet Res **7**: 43.
- Fornadel, C. M. and D. E. Norris (2008). "Increased endophily by the malaria vector *Anopheles arabiensis* in southern Zambia and identification of digested blood meals." The American journal of tropical medicine and hygiene **79**(6): 876-880.
- Fortin, A., A. Vibien, C. Therrien, D. Bolduc, F. Milord, G. Lebel, M. Troesch and O. Samuel (2013). Le risque relié au virus du Nil occidental au Québec et les interventions à privilégier en 2013 Institut national de santé publique du Québec, Québec, Canada.
- Foss, L., K. Padgett, W. K. Reisen, A. Kjemtrup, J. Ogawa and V. Kramer (2015). "West Nile virus-related trends in avian mortality in California, USA, 2003–12." Journal of wildlife diseases **51**(3): 576-588.
- Gagnon, C. A., J. M. Fairbrother and S. Lair (2021). "Bilan 2020 : Identification des pathogènes aviaires au Québec grâce à l'utilisation de tests moléculaires." Le Veterinarius + numéro 25, vol. 37 no 2: pages 1-4.
- Gamino, V. and U. Höfle (2013). "Pathology and tissue tropism of natural West Nile virus infection in birds: a review." Veterinary research **44**(1): 39-39.
- Gancz, A. Y., I. K. Barker, R. Lindsay, A. Dibernardo, K. McKeever and B. Hunter (2004). "West Nile virus outbreak in North American owls, Ontario, 2002." Emerg Infect Dis **10**(12): 2135-2142.
- Garcia-Rejon, J. E., B. J. Blitvich, J. A. Farfan-Ale, M. A. Loroño-Pino, W. A. Chi Chim, L. F. Flores-Flores, E. Rosado-Paredes, C. Baak-Baak, J. Perez-Mutul, V. Suarez-Solis, I. Fernandez-Salas and B. J. Beaty (2010). "Host-feeding preference of the mosquito, *Culex quinquefasciatus*, in Yucatan State, Mexico." J Insect Sci **10**: 32.
- Garmendia, A. E., H. J. Van Kruiningen and R. A. French (2001). "The West Nile virus: its recent emergence in North America." Microbes and Infection **3**(3): 223-229.

- Garros, C., L. Gardès, X. Allène, I. Rakotoarivony, E. Viennet, S. Rossi and T. Balenghien (2011). "Adaptation of a species-specific multiplex PCR assay for the identification of blood meal source in *Culicoides* (Ceratopogonidae: Diptera): applications on Palaearctic biting midge species, vectors of Orbiviruses." Infect Genet Evol **11**(5): 1103-1110.
- George, T. L., R. J. Harrigan, J. A. LaManna, D. F. DeSante, J. F. Saracco and T. B. Smith (2015). "Persistent impacts of West Nile virus on North American bird populations." Proceedings of the National Academy of Sciences **112**(46): 14290-14294.
- Gibbs, S. E., A. B. Allison, M. J. Yabsley, D. G. Mead, B. R. Wilcox and D. E. Stallknecht (2006). "West Nile virus antibodies in avian species of Georgia, USA: 2000-2004." Vector Borne Zoonotic Dis **6**(1): 57-72.
- Gibbs, S. E., D. M. Hoffman, L. M. Stark, N. L. Marlenee, B. J. Blitvich, B. J. Beaty and D. E. Stallknecht (2005). "Persistence of antibodies to West Nile virus in naturally infected rock pigeons (*Columba livia*)." Clin Diagn Lab Immunol **12**(5): 665-667.
- Gibbs, S. E., N. L. Marlenee, J. Romines, D. Kavanaugh, J. L. Corn and D. E. Stallknecht (2006). "Antibodies to West Nile virus in feral swine from Florida, Georgia, and Texas, USA." Vector-Borne & Zoonotic Diseases **6**(3): 261-265.
- Gibbs, S. E. J., A. B. Allison, M. J. Yabsley, D. G. Mead, B. R. Wilcox and D. E. Stallknecht (2006). "West Nile virus antibodies in avian species of Georgia, USA: 2000-2004." Vector-Borne and Zoonotic Diseases **6**(1): 57-72.
- Gibbs, S. E. J., D. M. Hoffman, L. M. Stark, N. L. Marlenee, B. J. Blitvich, B. J. Beaty and D. E. Stallknecht (2005). "Persistence of antibodies to West Nile virus in naturally infected rock pigeons (*Columba livia*)." Clinical and diagnostic laboratory immunology **12**(5): 665-667.
- Gingrich, J. B. and G. M. Williams (2005). "Host-feeding patterns of suspected West Nile virus mosquito vectors in Delaware, 2001-2002." Journal of the American Mosquito Control Association **21**(2): 194-200.
- Goddard, L. B., A. E. Roth, W. K. Reisen and T. W. Scott (2002). "Vector competence of California mosquitoes for West Nile virus." Emerg Infect Dis **8**(12): 1385-1391.
- Goddard, L. B., A. E. Roth, W. K. Reisen and T. W. Scott (2003). "Vertical transmission of West Nile Virus by three California *Culex* (Diptera: Culicidae) species." J Med Entomol **40**(6): 743-746.
- Godsey, M. S., Jr., M. S. Blackmore, N. A. Panella, K. Burkhalter, K. Gottfried, L. A. Halsey, R. Rutledge, S. A. Langevin, R. Gates, K. M. Lamonte, A. Lambert, R. S. Lanciotti, C. G. Blackmore, T. Loyless, L. Stark, R. Oliveri, L. Conti and N. Komar (2005). "West Nile virus epizootiology in the southeastern United States, 2001." Vector Borne Zoonotic Dis **5**(1): 82-89.
- Gollins, S. W. and J. S. Porterfield (1985). "Flavivirus infection enhancement in macrophages: an electron microscopic study of viral cellular entry." J Gen Virol **66 (Pt 9)**: 1969-1982.
- Gomes, B., C. A. Sousa, J. L. Vicente, L. Pinho, I. Calderón, E. Arez, A. P. G. Almeida, M. J. Donnelly and J. Pinto (2013). "Feeding patterns of molestus and pipiens forms of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in a region of high hybridization." Parasites & Vectors **6**(1): 93.

- González, M. A., S. W. Prosser, L. M. Hernández-Triana, P. M. Alarcón-Elbal, F. Goiri, S. López, I. Ruiz-Arrondo, P. D. N. Hebert and A. L. García-Pérez (2020). "Avian Feeding Preferences of *Culex pipiens* and *Culiseta* spp. Along an Urban-to-Wild Gradient in Northern Spain." Frontiers in Ecology and Evolution **8**(352).
- Greenberg, J. A., M. A. DiMenna, B. Hanelt and B. V. Hofkin (2012). "Analysis of post-blood meal flight distances in mosquitoes utilizing zoo animal blood meals." J Vector Ecol **37**(1): 83-89.
- Gurtler, R. E., J. E. Cohen, M. C. Cecere and R. Chuit (1997). "Shifting Host Choices of the Vector of Chagas Disease, *Triatoma Infestans*, in Relation to the Availability of Host in Houses in North-West Argentina." Journal of Applied Ecology **34**(3): 699-715.
- Guzman, M. G., G. Kouri, J. Bravo, L. Valdes, S. Vazquez and S. B. Halstead (2002). "Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections." Int J Infect Dis **6**(2): 118-124.
- Habarugira, G., W. W. Suen, J. Hobson-Peters, R. A. Hall and H. Bielefeldt-Ohmann (2020). "West Nile Virus: An Update on Pathobiology, Epidemiology, Diagnostics, Control and "One Health" Implications." Pathogens (Basel, Switzerland) **9**(7): 589.
- Hahn, D. C., N. M. Nemeth, E. Edwards, P. R. Bright and N. Komar (2006). "Passive West Nile virus antibody transfer from maternal Eastern screech-owls (*Megascops asio*) to progeny." Avian Dis **50**(3): 454-455.
- Hamer, G. L., U. D. Kitron, J. D. Brawn, S. R. Loss, M. O. Ruiz, T. L. Goldberg and E. D. Walker (2008). "*Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): A bridge vector of West Nile virus to humans." Journal of Medical Entomology **45**(1): 125-128.
- Hamer, G. L., U. D. Kitron, T. L. Goldberg, J. D. Brawn, S. R. Loss, M. O. Ruiz, D. B. Hayes and E. D. Walker (2009). "Host selection by *Culex pipiens* mosquitoes and west nile virus amplification." American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **80**(2): 268-278.
- Hardy, J. L., E. J. Houk, L. D. Kramer and W. C. Reeves (1983). "Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses." Annu Rev Entomol **28**: 229-262.
- Hassan, H. K., E. W. Cupp, G. E. Hill, C. R. Katholi, K. Klingler and T. R. Unnasch (2003). "Avian host preference by vectors of eastern equine encephalomyelitis virus." The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **69**(6): 641-647.
- Hawley, D. M. and S. M. Altizer (2011). "Disease ecology meets ecological immunology: understanding the links between organismal immunity and infection dynamics in natural populations." Functional Ecology **25**(1): 48-60.
- Hayes, C. G. (1988). "West Nile fever." Monath T.P. (ed.). The Arboviruses: Epidemiology and Ecology. Boca Raton: CRC Press, Inc. : 59-88.
- Hayes, E. B., N. Komar, R. S. Nasci, S. P. Montgomery, D. R. O'Leary and G. L. Campbell (2005). "Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease." Emerg Infect Dis **11**(8): 1167-1173.
- Hebert, P. D., S. Ratnasingham and J. R. deWaard (2003). "Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species." Proc Biol Sci **270** **Suppl 1**(Suppl 1): S96-99.

- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball and J. R. deWaard (2003). "Biological identifications through DNA barcodes." Proceedings. Biological sciences **270**(1512): 313-321.
- Heinz-Taheny, K. M., J. J. Andrews, M. J. Kinsel, A. P. Pessier, M. E. Pinkerton, K. Y. Lemberger, R. J. Novak, G. J. Dizikes, E. Edwards and N. Komar (2004). "West Nile virus infection in free-ranging squirrels in Illinois." Journal of veterinary diagnostic investigation **16**(3): 186-190.
- Heym, E. C., H. Kampen, M. Schäfer and D. Walther (2019). "Mosquito bloodmeal preferences in two zoological gardens in Germany." Medical and Veterinary Entomology **33**(2): 203-212.
- Higgs, S., B. S. Schneider, D. L. Vanlandingham, K. A. Klingler and E. A. Gould (2005). "Nonviremic transmission of West Nile virus." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(25): 8871-8874.
- Honig, V., H. E. Carolan, Z. Vavruskova, C. Massire, M. R. Mosel, C. D. Crowder, M. A. Rounds, D. J. Ecker, D. Ruzek, L. Grubhoffer, B. J. Luft and M. W. Eshoo (2017). "Broad-range survey of vector-borne pathogens and tick host identification of Ixodes ricinus from Southern Czech Republic." FEMS microbiology ecology **93**(11): fix129.
- Hubálek, Z., Z. Juricová, P. Straková, H. Blazejová, L. Betášová and I. Rudolf (2017). "Serological survey for West Nile virus in wild artiodactyls, Southern Moravia (Czech Republic)." Vector-Borne and Zoonotic Diseases **17**(9): 654-657.
- Hussain, M., G. Lu, S. Torres, J. H. Edmonds, B. H. Kay, A. A. Khromykh and S. Asgari (2013). "Effect of Wolbachia on Replication of West Nile Virus in a Mosquito Cell Line and Adult Mosquitoes." Journal of Virology **87**(2): 851.
- INSPQ (2016). "Proposition d'un programme de surveillance entomologique du virus du Nil occidental au Québec - Avis scientifique."
- Jiménez de Oya, N., E. Escribano-Romero, A.-B. Blázquez, M. A. Martín-Acebes and J.-C. Saiz (2019). "Current Progress of Avian Vaccines Against West Nile Virus." Vaccines **7**(4): 126.
- Jourdain, E., M. Gauthier-Clerc, D. J. Bicout and P. Sabatier (2007). "Bird Migration Routes and Risk for Pathogen Dispersion into Western Mediterranean Wetlands." Emerging Infectious Disease journal **13**(3): 365.
- Jourdain, E., I. Schuffenecker, J. Korimbocus, S. Reynard, S. Murri, Y. Kayser, M. Gauthier-Clerc, P. Sabatier and H. G. Zeller (2007). "West Nile virus in wild resident birds, Southern France, 2004." Vector Borne Zoonotic Dis **7**(3): 448-452.
- Jourdain, E., Y. Toussaint, A. Leblond, D. J. Bicout, P. Sabatier and M. Gauthier-Clerc (2007). "Bird species potentially involved in introduction, amplification, and spread of West Nile virus in a Mediterranean wetland, the Camargue (Southern France)." Vector Borne Zoonotic Dis **7**(1): 15-33.
- Jourdain, E., H. G. Zeller, P. Sabatier, S. Murri, Y. Kayser, T. Greenland, M. Lafaye and M. Gauthier-Clerc (2008). "Prevalence of West Nile virus neutralizing antibodies in wild birds from the Camargue area, southern France." J Wildl Dis **44**(3): 766-771.

- Joyner, P. H., S. Kelly, A. A. Shreve, S. E. Snead, J. M. Sleeman and D. A. Pettit (2006). "West Nile virus in raptors from Virginia during 2003: clinical, diagnostic, and epidemiologic findings." Journal of Wildlife Diseases **42**(2): 335-344.
- Julian, K. G., M. Eidson, A. M. Kipp, E. Weiss, L. R. Petersen, J. R. Miller, S. R. Hinten and A. A. Marfin (2002). "Early season crow mortality as a sentinel for West Nile virus disease in humans, northeastern United States." Vector Borne Zoonotic Dis **2**(3): 145-155.
- Juřicová, Z. and Z. Hubálek (1999). "Serological surveys for arboviruses in the game animals of southern Moravia (Czech Republic)." Folia zool **48**(3): 185-189.
- Kading, R. C., E. M. Borland, M. Cranfield and A. M. Powers (2013). "Prevalence of antibodies to alphaviruses and flaviviruses in free-ranging game animals and nonhuman primates in the greater Congo basin." Journal of wildlife diseases **49**(3): 587-599.
- Kading, R. C., R. M. Kityo, E. C. Mossel, E. M. Borland, T. Nakayiki, B. Nalikka, L. Nyakarahuka, J. P. Ledermann, N. A. Panella and A. T. Gilbert (2018). "Neutralizing antibodies against flaviviruses, Babanki virus, and Rift Valley fever virus in Ugandan bats." Infection ecology & epidemiology **8**(1): 1439215.
- Kain, M. P. and B. M. Bolker (2019). "Predicting West Nile virus transmission in North American bird communities using phylogenetic mixed effects models and eBird citizen science data." Parasites & vectors **12**(1): 1-22.
- Kang, D., K. Miyako, Y. Kai, T. Irie and K. Takeshige (1997). "In vivo determination of replication origins of human mitochondrial DNA by ligation-mediated polymerase chain reaction." J Biol Chem **272**(24): 15275-15279.
- Karin, B. R., E. S. Freitas, S. Shonleben, L. L. Grismer, A. M. Bauer and I. Das (2018). "Unrealized diversity in an urban rainforest: A new species of *Lygosoma* (Squamata: Scincidae) from western Sarawak, Malaysia (Borneo)." Zootaxa **4370**(4): 345-362.
- Karki, S., G. L. Hamer, T. K. Anderson, T. L. Goldberg, U. D. Kitron, B. L. Krebs, E. D. Walker and M. O. Ruiz (2016). "Effect of Trapping Methods, Weather, and Landscape on Estimates of the *Culex* Vector Mosquito Abundance." Environmental health insights **10**: 93-103.
- Kay, B. H., P. F. L. Boreham and G. M. Williams (1979). "Host preferences and feeding patterns of mosquitoes (Diptera: Culicidae) at Kowanyama, Cape York Peninsula, northern Queensland." Bulletin of Entomological Research **69**(3): 441-457.
- Keller, M. (2005). Development of a Competitive Inhibition Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ci Elisa) for Serosurvey of Wildlife Species for West Nile Virus, Emphasizing Marine Mammals, University of Florida.
- Kenney, J. L. and A. C. Brault (2014). "The role of environmental, virological and vector interactions in dictating biological transmission of arthropod-borne viruses by mosquitoes." Adv Virus Res **89**: 39-83.
- Kent, R. J. (2009). "Molecular methods for arthropod bloodmeal identification and applications to ecological and vector-borne disease studies." Molecular ecology resources **9**(1): 4-18.

- Kesavaraju, B., D. Kiyoguchi and S. Dickson (2011). "Efficacy of Gravid Traps in Trapping *Culex pipiens*." Journal of the American Mosquito Control Association **27**(3): 320-322, 323.
- Kilpatrick, A. M., D. M. Fonseca, G. D. Ebel, M. R. Reddy and L. D. Kramer (2010). "Spatial and Temporal Variation in Vector Competence of *Culex pipiens* and *Cx. restuans* Mosquitoes for West Nile Virus." The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **83**(3): 607-613.
- Kilpatrick, A. M., L. D. Kramer, S. R. Campbell, E. O. Alleyne, A. P. Dobson and P. Daszak (2005). "West Nile virus risk assessment and the bridge vector paradigm." Emerg Infect Dis **11**(3): 425-429.
- Kilpatrick, A. M., L. D. Kramer, S. R. Campbell, E. O. Alleyne, A. P. Dobson and P. Daszak (2005). "West Nile virus risk assessment and the bridge vector paradigm." Emerg Infect Dis **11**: 425-429.
- Kilpatrick, A. M., L. D. Kramer, M. J. Jones, P. P. Marra and P. Daszak (2006). "West Nile Virus Epidemics in North America Are Driven by Shifts in Mosquito Feeding Behavior." PLoS Biol **4**(4): e82.
- Kilpatrick, A. M., S. L. LaDeau and P. P. Marra (2007). "Ecology of West Nile Virus Transmission and Its Impact on Birds in the Western Hemisphere." The Auk **124**(4): 1121-1136.
- Kilpatrick, A. M., R. J. Peters, A. P. Dupuis, 2nd, M. J. Jones, P. P. Marra and L. D. Kramer (2013). "Predicted and observed mortality from vector-borne disease in small songbirds." Biol Conserv **165**: 79-85.
- Kilpatrick, A. M. and S. S. Wheeler (2019). "Impact of West Nile Virus on Bird Populations: Limited Lasting Effects, Evidence for Recovery, and Gaps in Our Understanding of Impacts on Ecosystems." Journal of Medical Entomology **56**(6): 1491-1497.
- Klenk, K. and N. Komar (2003). "Poor replication of West Nile virus (New York 1999 Strain) in three reptilian and one amphibian species." The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene Am J Trop Med Hyg **69**(3): 260-262.
- Klenk, K., J. Snow, K. Morgan, R. Bowen, M. Stephens, F. Foster, P. Gordy, S. Beckett, N. Komar, D. Gubler and M. Bunning (2004). "Alligators as West Nile virus amplifiers." Emerging infectious diseases **10**(12): 2150-2155.
- Knowlton, N. and L. A. Weigt (1998). "New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama." Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences **265**(1412): 2257-2263.
- Kocher, T. D., W. K. Thomas, A. Meyer, S. V. Edwards, S. Pääbo, F. X. Villablanca and A. C. Wilson (1989). "Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **86**(16): 6196-6200.
- Komar, N. (2001). "West Nile virus surveillance using sentinel birds." Ann N Y Acad Sci **951**: 58-73.

- Komar, N., J. Burns, C. Dean, N. A. Panella, S. Dusza and B. Cherry (2001). "Serologic evidence for West Nile virus infection in birds in Staten Island, New York, after an outbreak in 2000." Vector Borne Zoonotic Dis **1**(3): 191-196.
- Komar, N., D. J. Dohm, M. J. Turell and A. Spielman (1999). "Eastern equine encephalitis virus in birds: relative competence of European starlings (*Sturnus vulgaris*)." Am J Trop Med Hyg **60**(3): 387-391.
- Komar, N., S. Langevin, S. Hinten, N. Nemeth, E. Edwards, D. Hettler, B. Davis, R. Bowen and M. Bunning (2003). "Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus." Emerg Infect Dis **9**(3): 311-322.
- Komar, N., S. Langevin, S. Hinten, N. Nemeth, E. Edwards, D. L. Hettler, B. S. David, R. A. Bowen and M. L. Bunning (2003). "Experimental Infection of North American Birds with the New York 1999 Strain of West Nile Virus." Emerg Infect Dis **9**(3).
- Komar, N., N. A. Panella, J. E. Burns, S. W. Dusza, T. M. Mascarenhas and T. O. Talbot (2001). "Serologic evidence for West Nile virus infection in birds in the New York City vicinity during an outbreak in 1999." Emerg Infect Dis **7**(4): 621-625.
- Komar, N., N. A. Panella, S. A. Langevin, A. C. Brault, M. Amador, E. Edwards and J. C. Owen (2005). "Avian hosts for West Nile virus in St. Tammany Parish, Louisiana 2002." American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **73**(6): 1031-1037.
- Komar, N., N. A. Panella, S. A. Langevin, A. C. Brault, M. Amador, E. Edwards and J. C. Owen (2005). "Avian hosts for West Nile virus in St. Tammany Parish, Louisiana, 2002." Am J Trop Med Hyg **73**(6): 1031-1037.
- Komar, N., N. A. Panella, G. R. Young, A. C. Brault and C. E. Levy (2013). "Avian hosts of West Nile virus in Arizona." Am J Trop Med Hyg **89**(3): 474-481.
- Koné, P., Lambert, L., Milord, F. (2005). Épidémiologie et effets de l'infection par le virus du Nil occidental sur la santé humaine : mise à jour 2004, INSPQ.
- Koné, P., Lambert, L., Milord, F., Gariépy, C., avec la collaboration de J.-P. Bourassa, J. Boisvert et M. Couillard (2003). Épidémiologie et effets de l'infection par le virus du Nil occidental sur la santé humaine, mise à jour 2003, INSPQ.
- Kramer, L. D. and A. T. Ciota (2015). "Dissecting vectorial capacity for mosquito-borne viruses." Current Opinion in Virology **15**: 112-118.
- Kuno, G. (2003). Serodiagnosis of Flaviviral Infections and Vaccinations in Humans. Advances in Virus Research. T. J. Chambers and T. P. Monath, Academic Press. **61**: 3-65.
- LaDeau, S. L., C. A. Calder, P. J. Doran and P. P. Marra (2011). "West Nile virus impacts in American crow populations are associated with human land use and climate." Ecol Res **26**(5): 909-916.
- LaDeau, S. L., A. M. Kilpatrick and P. P. Marra (2007). "West Nile virus emergence and large-scale declines of North American bird populations." Nature **447**(7145): 710-713.

- Lamglait, B. and S. Lair (2019). "Fatal West Nile virus infection in a Virginia opossum (*Didelphis virginiana*) with pulmonary lepidic-predominant adenocarcinoma." Journal of wildlife diseases **55**(4): 990-994.
- Langevin, S. A., M. Bunning, B. Davis and N. Komar (2001). "Experimental infection of chickens as candidate sentinels for West Nile virus." Emerg Infect Dis **7**(4): 726-729.
- Levine, R. S., D. G. Mead, G. L. Hamer, B. J. Brosi, D. L. Hedeem, M. W. Hedeem, J. R. McMillan, D. Bisanzio and U. D. Kitron (2016). "Supersuppression: Reservoir Competency and Timing of Mosquito Host Shifts Combine to Reduce Spillover of West Nile Virus." American Journal of Tropical Medicine & Hygiene **95**(5): 1174-1184.
- Levine, R. S., D. G. Mead, G. L. Hamer, B. J. Brosi, D. L. Hedeem, M. W. Hedeem, J. R. McMillan, D. Bisanzio and U. D. Kitron (2016). "Supersuppression: reservoir competency and timing of mosquito host shifts combine to reduce spillover of West Nile virus." American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **95**(5): 1174-1184.
- Loss, S. R., G. L. Hamer, E. D. Walker, M. O. Ruiz, T. L. Goldberg, U. D. Kitron and J. D. Brawn (2009). "Avian host community structure and prevalence of West Nile virus in Chicago, Illinois." Oecologia **159**(2): 415-424.
- Ludwig, A., M. Bigras-Poulin and P. Michel (2009). "The Analysis of Crow Population Dynamics as a Surveillance Tool." Transboundary and Emerging Diseases **56**(9-10): 337-345.
- Ludwig, A., M. Bigras-Poulin, P. Michel and D. Bélanger (2010). "RISK FACTORS ASSOCIATED WITH WEST NILE VIRUS MORTALITY IN AMERICAN CROW POPULATIONS IN SOUTHERN QUEBEC." Journal of Wildlife Diseases **46**(1): 195-208.
- Ludwig, G. V., P. P. Calle, J. A. Mangiafico, B. L. Raphael, D. K. Danner, J. A. Hile, T. L. Clippinger, J. F. Smith, R. A. Cook and T. McNamara (2002). "An outbreak of West Nile virus in a New York City captive wildlife population." The American journal of tropical medicine and hygiene **67**(1): 67-75.
- Lura, T., R. Cummings, R. Velten, K. De Collibus, T. Morgan, K. Nguyen and A. Gerry (2012). "Host (avian) biting preference of southern California *Culex* mosquitoes (Diptera: Culicidae)." J Med Entomol **49**(3): 687-696.
- Maciel-de-Freitas, R., A. E. Eiras and R. Lourenco-de-Oliveira (2006). "Field evaluation of effectiveness of the BG-Sentinel, a new trap for capturing adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)." Mem Inst Oswaldo Cruz **101**(3): 321-325.
- Madder, D. J., G. A. Surgeoner and B. V. Helson (1983). "Number of generations, egg production, and developmental time of *Culex pipiens* and *Culex restauns* (Diptera: Culicidae) in southern Ontario." J Med Entomol **20**(3): 275-287.
- Maezono, K., S. Kobayashi, K. Tabata, K. Yoshii and H. Kariwa (2021). "Development of a highly specific serodiagnostic ELISA for West Nile virus infection using subviral particles." Scientific Reports **11**(1): 9213.

- Maleki-Ravasan, N., M. Oshaghi, E. Javadian, Y. Rassi, J. Sadraei and F. Mohtarami (2009). "Blood Meal Identification in Field-Captured Sand flies: Comparison of PCR-RFLP and ELISA Assays." Iranian journal of arthropod-borne diseases **3**(1): 8-18.
- Marm Kilpatrick, A., P. Daszak, M. J. Jones, P. P. Marra and L. D. Kramer (2006). "Host heterogeneity dominates West Nile virus transmission." Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences **273**(1599): 2327-2333.
- Marra, P., S. Griffing, C. Caffrey, A. Kilpatrick, R. McLean, C. Brand, E. Saito, A. Dupuis li, L. Kramer and R. Novak (2004). West Nile Virus and Wildlife.
- Martínez-de la Puente, J., M. Ferraguti, S. Ruiz, D. Roiz, F. Llorente, E. Pérez-Ramírez, M. Á. Jiménez-Clavero, R. Soriguer and J. Figuerola (2018). "Mosquito community influences West Nile virus seroprevalence in wild birds: implications for the risk of spillover into human populations." Scientific Reports **8**(1): 2599.
- Martínez-de la Puente, J., R. Soriguer, J. C. Senar, J. Figuerola, R. Bueno-Mari and T. Montalvo (2020). "Mosquitoes in an Urban Zoo: Identification of Blood Meals, Flight Distances of Engorged Females, and Avian Malaria Infections." Frontiers in Veterinary Science **7**(460).
- May, F. J., C. T. Davis, R. B. Tesh and A. D. T. Barrett (2011). "Phylogeography of West Nile Virus: from the Cradle of Evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas." Journal of Virology **85**(6): 2964.
- Mayer, F., C. Dietz and A. Kiefer (2007). "Molecular species identification boosts bat diversity." Frontiers in zoology **4**: 4-4.
- McLean, R. G. (2006). "West Nile virus in North American birds." Ornithological Monographs: 44-64.
- Medica, D. L., R. Clauser and K. Bildstein (2007). "Prevalence of west Nile virus antibodies in a breeding population of American Kestrels (*Falco sparverius*) in Pennsylvania." J Wildl Dis **43**(3): 538-541.
- Metzger, M. E., J. E. Harbison, J. E. Burns and R. Hu (2012). "Ability of newly emerged adult *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) mosquitoes to exit belowground stormwater treatment systems via lateral conveyance pipes." J Med Entomol **49**(2): 343-349.
- Miller, N., R. C. Mettelman, S. C. Baker and J. E. Harbison (2015). "Use of Centers for Disease Control and Prevention Gravid Trap in Catch Basins: Proof-Of-Concept Trials." J Am Mosq Control Assoc **31**(2): 196-199.
- Molaei, G., T. Andreadis, P. Armstrong, J. Anderson and C. Vossbrinck (2006). "Host Feeding Patterns of *Culex* Mosquitoes and West Nile Virus Transmission, Northeastern United States." Emerging Infectious Disease journal **12**(3): 468.
- Molaei, G. and T. G. Andreadis (2006). "Identification of Avian- and Mammalian-Derived Bloodmeals in *Aedes vexans* and *Culiseta melanura* (Diptera: Culicidae) and Its Implication for West Nile Virus Transmission in Connecticut, U.S.A." Journal of Medical Entomology **43**(5): 1088-1093.

- Monaco, F., R. Lelli, L. Teodori, C. Pinoni, A. Di Gennaro, A. Polci, P. Calistri and G. Savini (2010). "Re-emergence of West Nile virus in Italy." Zoonoses Public Health **57**(7-8): 476-486.
- Monath, T. P., J. Arroyo, C. Miller and F. Guirakhoo (2001). "West Nile virus vaccine." Curr Drug Targets Infect Disord **1**(1): 37-50.
- Mostashari, F., M. Kulldorff, J. J. Hartman, J. R. Miller and V. Kulasekera (2003). "Dead bird clusters as an early warning system for West Nile virus activity." Emerg Infect Dis **9**(6): 641-646.
- Moudy, R. M., M. A. Meola, L.-L. L. Morin, G. D. Ebel and L. D. Kramer (2007). "A newly emergent genotype of West Nile virus is transmitted earlier and more efficiently by Culex mosquitoes." The American journal of tropical medicine and hygiene **77**(2): 365-370.
- Mucci, L. F., R. P. C. Júnior, M. B. de Paula, S. A. S. Scandar, M. L. Pacchioni, A. Fernandes and C. A. Consales (2015). "Feeding habits of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in an area of sylvatic transmission of yellow fever in the state of São Paulo, Brazil." The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases **21**: 6-6.
- Mukabana, W. R., W. Takken and B. G. Knols (2002). "Analysis of arthropod bloodmeals using molecular genetic markers." Trends in parasitology **18**(11): 505-509.
- Mukhopadhyay, S., B. S. Kim, P. R. Chipman, M. G. Rossmann and R. J. Kuhn (2003). "Structure of West Nile virus." Science **302**(5643): 248.
- Muñoz, J., R. Eritja, M. Alcaide, T. Montalvo, R. C. Soriguer and J. Figuerola (2011). "Host-Feeding Patterns of Native *Culex pipiens* and Invasive *Aedes albopictus* Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Urban Zones from Barcelona, Spain." Journal of Medical Entomology **48**(4): 956-960, 955.
- Murphy, W. J., E. Eizirik, W. E. Johnson, Y. P. Zhang, O. A. Ryder and S. J. O'Brien (2001). "Molecular phylogenetics and the origins of placental mammals." Nature **409**(6820): 614-618.
- Nasci, R. and N. RS (1981). "A LIGHTWEIGHT BATTERY-POWERED ASPIRATOR FOR COLLECTING RESTING MASQUITOES IN THE FIELD."
- Nemeth, N., G. Kratz, R. Bates, J. Scherpelz, R. Bowen and N. Komar (2008). "Naturally Induced Humoral Immunity to West Nile Virus Infection in Raptors." EcoHealth **5**: 298-304.
- Nemeth, N., G. Young, C. Ndaluka, H. Bielefeldt-Ohmann, N. Komar and R. Bowen (2009). "Persistent West Nile virus infection in the house sparrow (Passer domesticus)." Archives of Virology **154**(5): 783-789.
- Nemeth, N. M., G. E. Kratz, R. Bates, J. A. Scherpelz, R. A. Bowen and N. Komar (2008). "Naturally Induced Humoral Immunity to West Nile Virus Infection in Raptors." EcoHealth **5**(3): 298-304.
- Nemeth, N. M., P. T. Oesterle and R. A. Bowen (2009). "Humoral immunity to West Nile virus is long-lasting and protective in the house sparrow (Passer domesticus)." The American journal of tropical medicine and hygiene **80**(5): 864-869.
- Newhouse, V. F., R. Chamberlain, J. Johnston and W. D. Sudia (1966). "Use of dry ice to increase mosquito catches of the CDC miniature light trap." Mosq. News **26**(1): 30-35.

- Nicholls, T. J. and M. Minczuk (2014). "In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA." Exp Gerontol **56**: 175-181.
- Obeid, M. F. and J. Shull (2013). West Nile virus system dynamics investigation in Dallas County, TX. 2013 Winter Simulations Conference (WSC), IEEE.
- Ostfeld, R. S. and F. Keesing (2000). "Pulsed resources and community dynamics of consumers in terrestrial ecosystems." Trends Ecol Evol **15**(6): 232-237.
- Ouhoumanne, N., A. M. Lowe, A. Fortin, D. Kairy, A. Vibien, J. K-Lensch, T. N. Tannenbaum and F. Milord (2018). "Morbidity, mortality and long-term sequelae of West Nile virus disease in Québec." Epidemiology and Infection **146**(7): 867-874.
- Ouhoumanne, N., A.-M. Lowe, C. Back, G. Lebel, F. Milord, C. Therrien, S. Lair and I. Picard (2014). Surveillance de l'infection par le virus du Nil occidental au Québec. Saison 2013, Institut national de santé publique du Québec, Québec, Canada.
- Owen, J. C., H. R. Landwerlen, A. P. Dupuis, A. V. Belsare, D. B. Sharma, S. Wang, A. T. Ciota and L. D. Kramer (2021). "Reservoir hosts experiencing food stress alter transmission dynamics for a zoonotic pathogen." Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences **288**(1956): 20210881.
- Pachler, K., K. Lebl, D. Berer, I. Rudolf, Z. Hubalek and N. Nowotny (2014). "Putative new West Nile virus lineage in Uranotaenia unguiculata mosquitoes, Austria, 2013." Emerging infectious diseases **20**(12): 2119-2122.
- Panella, N. A., K. L. Burkhalter, S. A. Langevin, A. C. Brault, L. M. Schooley, B. J. Biggerstaff, R. S. Nasci and N. Komar (2005). "Rapid West Nile virus antigen detection." Emerg Infect Dis **11**(10): 1633-1635.
- Papa, A., T. Bakonyi, K. Xanthopoulou, A. Vázquez, A. Tenorio and N. Nowotny (2011). "Genetic characterization of West Nile virus lineage 2, Greece, 2010." Emerging infectious diseases **17**(5): 920-922.
- Paz, S. (2015). "Climate change impacts on West Nile virus transmission in a global context." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **370**(1665).
- Pedersen, K., E. Wang, S. C. Weaver, P. C. Wolf, A. R. Randall, K. R. Van Why, A. P. T. Da Rosa and T. Gidlewski (2017). "Serologic evidence of various arboviruses detected in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in the United States." The American journal of tropical medicine and hygiene **97**(2): 319-323.
- Pérez-Ramírez, E., F. Llorente and M. Á. Jiménez-Clavero (2014). "Experimental infections of wild birds with West Nile virus." Viruses **6**(2): 752-781.
- Philip, C. B. and J. E. Smadel (1943). "Transmission of West Nile Virus by Infected *Aedes albopictus*." Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine **53**(1): 49-50.
- Pierson, T. C. and M. S. Diamond (2012). "Degrees of maturity: the complex structure and biology of flaviviruses." Curr Opin Virol **2**(2): 168-175.

QuébecOiseaux. (2020). "Suivi des populations : Banque de données ÉPOQ." 2020, from <https://quebecoiseaux.org/index.php/fr/dossiers/suivi-des-populations/723-banque-de-donnees-epoq>.

Randall, N. J., B. J. Blitvich and J. A. Blanchong (2013). "Association between agricultural land use and West Nile virus antibody prevalence in Iowa birds." *J Wildl Dis* **49**(4): 869-878.

Rappole, J. H., S. R. Derrickson and Z. Hubalek (2000). "Migratory birds and spread of West Nile virus in the Western Hemisphere." *Emerging Infectious Diseases* **6**(4): 319-328.

Rappole, J. H. and Z. Hubálek (2003). "Migratory birds and West Nile virus." *Journal of Applied Microbiology* **94**(s1): 47-58.

Ratnasingham, S. and P. D. N. Hebert (2007). "bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>)." *Molecular ecology notes* **7**(3): 355-364.

Reeves, L. E., J. L. Gillett-Kaufman, A. Y. Kawahara and P. E. Kaufman (2018). "Barcoding blood meals: New vertebrate-specific primer sets for assigning taxonomic identities to host DNA from mosquito blood meals." *PLoS neglected tropical diseases* **12**(8): e0006767-e0006767.

Reeves, L. E., C. J. Holderman, J. L. Gillett-Kaufman, A. Y. Kawahara and P. E. Kaufman (2016). "Maintenance of host DNA integrity in field-preserved mosquito (Diptera: Culicidae) blood meals for identification by DNA barcoding." *Parasites & Vectors* **9**(1): 503.

Reisen, W. K., Y. Fang and V. Martinez (2007). "Is nonviremic transmission of West Nile virus by Culex mosquitoes (Diptera: Culicidae) nonviremic?" *J Med Entomol* **44**(2): 299-302.

Reisen, W. K., Y. Fang and V. M. Martinez (2005). "Avian Host and Mosquito (Diptera: Culicidae) Vector Competence Determine the Efficiency of West Nile and St. Louis Encephalitis Virus Transmission." *Journal of Medical Entomology* **42**(3): 367-375.

Reiskind, M. H. and M. L. Wilson (2004). "Culex restuans (Diptera: Culicidae) oviposition behavior determined by larval habitat quality and quantity in southeastern Michigan." *J Med Entomol* **41**(2): 179-186.

Ribeiro, J. M., B. Arcà, F. Lombardo, E. Calvo, V. M. Phan, P. K. Chandra and S. K. Wikel (2007). "An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, Aedes aegypti." *BMC Genomics* **8**: 6.

Ribeiro, J. M., R. Charlab and J. G. Valenzuela (2001). "The salivary adenosine deaminase activity of the mosquitoes Culex quinquefasciatus and Aedes aegypti." *J Exp Biol* **204**(Pt 11): 2001-2010.

Richards, S. L., C. C. Lord, K. N. Pesko and W. J. Tabachnick (2010). "Environmental and biological factors influencing Culex pipiens quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) vector competence for West Nile Virus." *The American journal of tropical medicine and hygiene* **83**(1): 126-134.

Ringia, A. M., B. J. Blitvich, H. Y. Koo, M. Van de Wyngaerde, J. D. Brawn and R. J. Novak (2004). "Antibody prevalence of West Nile virus in birds, Illinois, 2002." *Emerg Infect Dis* **10**(6): 1120-1124.

- Ringia, A. M., B. J. Blitvich, H. Y. Koo, M. v. d. Wyngaerde, J. D. Brawn and R. J. Novak (2004). "Antibody prevalence of West Nile virus in birds, Illinois, 2002." Emerging Infectious Diseases **10**(6): 1120-1124.
- Ritchie, B. W. (1995). "Avian viruses: function and control." Avian viruses: Function and Control.
- Rizzoli, A., L. Bolzoni, E. A. Chadwick, G. Capelli, F. Montarsi, M. Grisenti, J. M. de la Puente, J. Munoz, J. Figuerola, R. Soriguer, G. Anfora, M. Di Luca and R. Rosa (2015). "Understanding West Nile virus ecology in Europe: Culex pipiens host feeding preference in a hotspot of virus emergence." Parasit Vectors **8**: 213.
- Rocheleau, J. P., P. Michel, L. R. Lindsay, M. Drebot, A. Dibernardo, N. H. Ogden, A. Fortin and J. Arsenault (2017). "Characterizing environmental risk factors for West Nile virus in Quebec, Canada, using clinical data in humans and serology in pet dogs." Epidemiol Infect **145**(13): 2797-2807.
- Rochlin, I., A. Faraji, K. Healy and T. G. Andreadis (2019). "West Nile Virus Mosquito Vectors in North America." Journal of Medical Entomology **56**(6): 1475-1490.
- Rodhain, F. (1998). "La notion de réservoir naturel en arbovirologie." Bull. Soc. Pathol. Exot. **91**(4): 279-282.
- Root, J. J., K. T. Bentler, N. M. Nemeth, T. Gidlewski, T. R. Spraker and A. B. Franklin (2010). "Experimental infection of raccoons (Procyon lotor) with West Nile virus." The American journal of tropical medicine and hygiene **83**(4): 803-807.
- Root, J. J. and A. M. Bosco-Lauth (2019). "West Nile Virus Associations in Wild Mammals: An Update." Viruses **11**(5): 459.
- Ruiz, M. O., L. F. Chaves, G. L. Hamer, T. Sun, W. M. Brown, E. D. Walker, L. Haramis, T. L. Goldberg and U. D. Kitron (2010). "Local impact of temperature and precipitation on West Nile virus infection in Culex species mosquitoes in northeast Illinois, USA." Parasit Vectors **3**(1): 19.
- Ryelandt, J., F. Noireau and C. R. Lazzari (2011). "A multimodal bait for trapping blood-sucking arthropods." Acta Trop **117**(2): 131-136.
- Saccone, C., C. De Giorgi, C. Gissi, G. Pesole and A. Reyes (1999). "Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system." Gene **238**(1): 195-209.
- Saito, E. K., L. Sileo, D. E. Green, C. U. Meteyer, G. S. McLaughlin, K. A. Converse and D. E. Docherty (2007). "Raptor mortality due to West Nile virus in the United States, 2002." Journal of Wildlife Diseases **43**(2): 206-213.
- Samuel, P. P., V. Thenmozhi, J. Nagaraj, T. D. Kumar and B. K. Tyagi (2014). "Dengue vectors prevalence and the related risk factors involved in the transmission of dengue in Thiruvananthapuram district, Kerala, South India." J Vector Borne Dis **51**(4): 313-319.
- Sardelis, M. R., M. J. Turell, D. J. Dohm and M. L. O'Guinn (2001). "Vector competence of selected North American Culex and Coquillettidia mosquitoes for West Nile virus." Emerg Infect Dis **7**(6): 1018-1022.

- Sawabe, K., H. Isawa, K. Hoshino, T. Sasaki, S. Roychoudhury, Y. Higa, S. Kasai, Y. Tsuda, I. Nishiumi, N. Hisai, S. Hamao and M. Kobayashi (2010). "Host-feeding habits of *Culex pipiens* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) collected at the urban and suburban residential areas of Japan." J Med Entomol **47**(3): 442-450.
- Schäfer, M. L., J. O. Lundström, M. Pfeffer, E. Lundkvist and J. Landin (2004). "Biological diversity versus risk for mosquito nuisance and disease transmission in constructed wetlands in southern Sweden." Medical and Veterinary Entomology **18**(3): 256-267.
- Scherret, J. H., M. Poidinger, J. S. Mackenzie, A. K. Broom, V. Deubel, W. I. Lipkin, T. Briese, E. A. Gould and R. A. Hall (2001). "The relationships between West Nile and Kunjin viruses." Emerging infectious diseases **7**(4): 697-705.
- Schmidt, K. A. and R. S. Ostfeld (2001). "Biodiversity and the dilution effect in disease ecology." Ecology **82**(3): 609-619.
- Shahhosseini, N., C. Frederick, T. Racine, G. P. Kobinger and G. Wong (2021). "Modeling host-feeding preference and molecular systematics of mosquitoes in different ecological niches in Canada." Acta Tropica **213**: 105734.
- Shahhosseini, N., J. Friedrich, S. H. Moosa-Kazemi, M. M. Sedaghat, M. H. Kayedi, E. Tannich, J. Schmidt-Chanasit and R. Lühken (2018). "Host-feeding patterns of *Culex* mosquitoes in Iran." Parasites & Vectors **11**(1): 669.
- Shi, P.-Y., E. B. Kauffman, P. Ren, A. Felton, J. H. Tai, A. P. Dupuis, S. A. Jones, K. A. Ngo, D. C. Nicholas and J. Maffei (2001). "High-throughput detection of West Nile virus RNA." Journal of Clinical Microbiology **39**(4): 1264-1271.
- Simon, C., L. Nigro, J. Sullivan, K. Holsinger, A. Martin, A. Grapputo, A. Franke and C. McIntosh (1996). "Large differences in substitutional pattern and evolutionary rate of 12S ribosomal RNA genes." Mol Biol Evol **13**(7): 923-932.
- Simpson, J. E., P. J. Hurtado, J. Medlock, G. Molaei, T. G. Andreadis, A. P. Galvani and M. A. Diuk-Wasser (2012). "Vector host-feeding preferences drive transmission of multi-host pathogens: West Nile virus as a model system." Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences **279**(1730): 925-933.
- Smith, K. A., G. D. Campbell, D. L. Pearl, C. M. Jardine, F. Salgado-Bierman and N. M. Nemeth (2018). "A retrospective summary of raptor mortality in Ontario, Canada (1991–2014), including the effects of West Nile Virus." Journal of wildlife diseases **54**(2): 261-271.
- Soares, V. Y., J. C. Silva, K. R. Silva, S. Pires e Cruz Mdo, M. P. Santos, P. E. Ribolla, D. P. Alonso, L. F. Coelho, D. L. Costa and C. H. Costa (2014). "Identification of blood meal sources of *Lutzomyia longipalpis* using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the cytochrome B gene." Mem Inst Oswaldo Cruz **109**(3): 379-383.
- Spitzen, J., R. C. Smallegange and W. Takken (2008). "Effect of human odours and positioning of CO₂ release point on trap catches of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* sensu stricto in an olfactometer." Physiological Entomology **33**(2): 116-122.

Sriwichai, P., S. Karl, Y. Samung, S. Sumruayphol, K. Kiattibutr, A. Payakkapol, I. Mueller, G. Yan, L. Cui and J. Sattabongkot (2015). "Evaluation of CDC light traps for mosquito surveillance in a malaria endemic area on the Thai-Myanmar border." Parasites & vectors **8**: 636-636.

Steele, K., M. Linn, R. Schoepp, N. Komar, T. Geisbert, R. Manduca, P. Calle, B. Raphael, T. Clippinger and T. Larsen (2000). "Pathology of fatal West Nile virus infections in native and exotic birds during the 1999 outbreak in New York City, New York." Veterinary pathology **37**(3): 208-224.

Stone, W. B., J. C. Okoniewski, J. E. Therrien, L. D. Kramer, E. B. Kauffman and M. Eidson (2004). "VecTest as diagnostic and surveillance tool for West Nile virus in dead birds." Emerging infectious diseases **10**(12): 2175-2181.

Stone, W. B., J. E. Therrien, R. Benson, L. Kramer, E. B. Kauffman, M. Eldson and S. Campbell (2005). "Assays to detect West Nile virus in dead birds." Emerging infectious diseases **11**(11): 1770-1773.

Sullivan, B. L., C. L. Wood, M. J. Iliff, R. E. Bonney, D. Fink and S. Kelling (2009). "eBird: A citizen-based bird observation network in the biological sciences." Biological conservation **142**(10): 2282-2292.

Swetnam, D., S. G. Widen, T. G. Wood, M. Reyna, L. Wilkerson, M. Debboun, D. A. Symonds, D. G. Mead, B. J. Beaty, H. Guzman, R. B. Tesh and A. D. T. Barrett (2018). "Terrestrial Bird Migration and West Nile Virus Circulation, United States." Emerging infectious diseases **24**(12): 2184-2194.

Taylor, R. M., T. H. Work, H. S. Hurlbut and F. Rizk (1956). "A Study of the Ecology of West Nile Virus in Egypt1." The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **5**(4): 579-620.

Thiemann, T. C., D. A. Lemenager, S. Kluh, B. D. Carroll, H. D. Lothrop and W. K. Reisen (2012). "Spatial variation in host feeding patterns of *Culex tarsalis* and the *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) in California." Journal of medical entomology **49**(4): 903-916.

Thiemann, T. C., S. S. Wheeler, C. M. Barker and W. K. Reisen (2011). "Mosquito host selection varies seasonally with host availability and mosquito density." PLoS neglected tropical diseases **5**(12): e1452-e1452.

Thomas-Bachli, A. L., D. L. Pearl, O. Berke, E. J. Parmley and I. K. Barker (2015). "A comparison of West Nile virus surveillance using survival analyses of dead corvid and mosquito pool data in Ontario, 2002–2008." Preventive veterinary medicine **122**(3): 363-370.

Thomas-Bachli, A. L., D. L. Pearl, E. J. Parmley and O. Berke (2020). "The Influence of Sociodemographic Factors on the Engagement of Citizens in the Detection of Dead Corvids During the Emergence of West Nile Virus in Ontario, Canada." Frontiers in Veterinary Science **6**(483).

Tobe, S. S., A. C. Kitchener and A. M. T. Linacre (2010). "Reconstructing mammalian phylogenies: a detailed comparison of the cytochrome B and cytochrome oxidase subunit I mitochondrial genes." PloS one **5**(11): e14156-e14156.

Tomazatos, A., S. Jansen, S. Pfister, E. Török, I. Maranda, C. Horváth, L. Keresztes, M. Spînu, E. Tannich, H. Jöst, J. Schmidt-Chanasit, D. Cadar and R. Lühken (2019). "Ecology of West Nile Virus

in the Danube Delta, Romania: Phylogeography, Xenosurveillance and Mosquito Host-Feeding Patterns." Viruses **11**(12): 1159.

Turell, M. J., D. J. Dohm, M. R. Sardelis, M. L. O'Guinn, T. G. Andreadis and J. A. Blow (2005). "An update on the potential of North American mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile virus." Journal of Medical Entomology **42**(1): 57-62.

Turell, M. J., M. O'Guinn and J. Oliver (2000). "Potential for New York mosquitoes to transmit West Nile virus." Am J Trop Med Hyg **62**(3): 413-414.

Turell, M. J., M. L. O'Guinn, D. J. Dohm and J. W. Jones (2001). "Vector Competence of North American Mosquitoes (Diptera: Culicidae) for West Nile Virus." Journal of Medical Entomology **38**(2): 130-134, 135.

Turell, M. J., M. R. Sardelis, M. L. O'Guinn and D. J. Dohm (2002). "Potential vectors of West Nile virus in North America." Curr Top Microbiol Immunol **267**: 241-252.

Valinsky, L., G. Ettinger, G. K. Bar-Gal and L. Orshan (2014). "Molecular identification of bloodmeals from sand flies and mosquitoes collected in Israel." J Med Entomol **51**(3): 678-685.

van der Meulen, K. M., M. B. Pensaert and H. J. Nauwynck (2005). "West Nile virus in the vertebrate world." Arch Virol **150**(4): 637-657.

Vences, M., M. Thomas, A. van der Meijden, Y. Chiari and D. R. Vieites (2005). "Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians." Frontiers in zoology **2**(1): 5-5.

Verhagen, J. H., R. A. M. Fouchier and N. Lewis (2021). "Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses at the Wild-Domestic Bird Interface in Europe: Future Directions for Research and Surveillance." Viruses **13**(2).

Vidaña, B., N. Busquets, S. Napp, E. Pérez-Ramírez, M. Á. Jiménez-Clavero and N. Johnson (2020). "The role of birds of prey in West Nile virus epidemiology." Vaccines **8**(3): 550.

Vieira, M. A. C. S., A. P. M. Romano, A. S. Borba, E. V. P. Silva, J. O. Chiang, K. D. Eulálio, R. S. S. Azevedo, S. G. Rodrigues, W. S. Almeida-Neto and P. F. C. Vasconcelos (2015). "West Nile Virus Encephalitis: The First Human Case Recorded in Brazil." The American journal of tropical medicine and hygiene **93**(2): 377-379.

Vogels, C. B. F., G. P. Göertz, G. P. Pijlman and C. J. M. Koenraadt (2017). "Vector competence of European mosquitoes for West Nile virus." Emerging Microbes & Infections **6**(1): 1-13.

Walton, W. E., E. T. Schreiber and M. S. Mulla (1990). "Distribution of *Culex tarsalis* larvae in a freshwater marsh in Orange County, California." J Am Mosq Control Assoc **6**(3): 539-543.

Ward, M. P., A. Raim, S. Yaremych-Hamer, R. Lampman and R. J. Novak (2006). "Does the roosting behavior of birds affect transmission dynamics of West Nile virus?" Am J Trop Med Hyg **75**(2): 350-355.

Wheeler, S. S., C. M. Barker, Y. Fang, M. Veronica Armijos, B. D. Carroll, S. Husted, W. O. Johnson and W. K. Reisen (2009). "Differential Impact of West Nile Virus on California Birds." The Condor **111**(1): 1-20.

- Wolff, G. H. and J. A. Riffell (2018). "Olfaction, experience and neural mechanisms underlying mosquito host preference." Journal of Experimental Biology **221**(4).
- Work, T. H., H. S. Hurlbut and R. M. Taylor (1953). "Isolation of West Nile virus from hooded crow and rock pigeon in the Nile delta." Proc Soc Exp Biol Med **84**(3): 719-722.
- Work, T. H., H. S. Hurlbut and R. M. Taylor (1955). "Indigenous Wild Birds of the Nile Delta as Potential West Nile Virus Circulating Reservoirs1." The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **4**(5): 872-888.
- Worwa, G., A. A. Hutton, A. C. Brault and W. K. Reisen (2019). "Comparative fitness of West Nile virus isolated during California epidemics." PLoS Negl Trop Dis **13**(2): e0007135.
- Yan, J., L. Gangoso, J. Martínez-de la Puente, R. Soriguer and J. Figuerola (2017). "Avian phenotypic traits related to feeding preferences in two Culex mosquitoes." Naturwissenschaften **104**(9-10): 76.
- Zeller, H. G. and I. Schuffenecker (2004). "West Nile virus: an overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **23**(3): 147-156.
- Zhang, C., G. Shi, P. Cheng, L. Liu and M. Gong (2017). "Host preferences and feeding patterns of Anopheles sinensis Wiedemann in three sites of Shandong province, China." J Vector Borne Dis **54**(4): 328-333.
- Zhang, G. (2020). "Spatial and temporal patterns in volunteer data contribution activities: A case study of eBird." ISPRS International Journal of Geo-Information **9**(10): 597.