



HAL
open science

La Brucellose chez les mammifères marins échoués sur les côtes françaises de la Manche de 1995 à nos jours : enquêtes épidémiologique et anatomo-pathologique

Allison Balin

► To cite this version:

Allison Balin. La Brucellose chez les mammifères marins échoués sur les côtes françaises de la Manche de 1995 à nos jours : enquêtes épidémiologique et anatomo-pathologique. Médecine vétérinaire et santé animale. 2016. dumas-04546151

HAL Id: dumas-04546151

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04546151>

Submitted on 15 Apr 2024

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

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



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/>
Eprints ID : 17315

To cite this version :

Balin, Allison. *La Brucellose chez les mammifères marins échoués sur les côtes françaises de la Manche de 1995 à nos jours : enquêtes épidémiologique et anatomo-pathologique*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2016, 245 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr

LA BRUCELLOSE CHEZ LES MAMMIFÈRES MARINS ÉCHOUÉS SUR LES CÔTES FRANÇAISES DE LA MANCHE DE 1995 A NOS JOURS : ENQUETE EPIDEMIOLOGIQUE ET ANATOMO-PATHOLOGIQUE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

BALIN Allison

Née, le 09 juillet 1991 à Narbonne (11)

Directeur de thèse : Mme Hélène DANIELS

JURY

PRESIDENT :

M. Patrice MASSIP

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSEESSEURS :

Mme Hélène DANIELS
M. Guillaume LE LOC'H

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

MEMBRE INVITE :

M. Thierry JAUNIAUX

Docteur Vétérinaire à l'Université Vétérinaire de Liège

Répartition des Enseignants-Chercheurs par Département.

Mise à jour : 06/09/2016

DIRECTRICE : ISABELLE CHMITELIN

| ELEVAGE ET PRODUITS/SANTÉ PUBLIQUE VÉTÉRINAIRE | SCIENCES BIOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES | SCIENCES CLINIQUES DES ANIMAUX DE COMPAGNIE, DE SPORT ET DE LOISIRS |
|--|---|---|
| <p>Responsable : M. SANS</p> <p><u>ALIMENTATION ANIMALE :</u> M. ENJALBERT Francis, PR Mme PRIYMENKO Nathalie, MC Mme MEYNADIER Annabelle, MC</p> <p><u>EPIDEMIOLOGIE :</u> Mathilde PAUL, MC</p> <p><u>MALADIES REGLEMENTEES-ZOONOSES-MEDECINE PREVENTIVE DES CARNIVORES DOMESTIQUES-DROIT VETERINAIRE :</u> M. PICAUVET Dominique, PR</p> <p><u>PARASITOLOGIE-ZOOLOGIE :</u> M. FRANC Michel, PR M. JACQUIET Philippe, PR M. LIENARD Emmanuel, MC Mme BOUHSIRA Emilie, MC</p> <p><u>HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS :</u> M. BRUGERE Hubert, PR M. BAILLY Jean-Denis, PR Mme BIBBAL Delphine, MC Mme COSTES Laura, AERC Mme DAVID Laure, MCC</p> <p><u>PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION :</u> M. BERTHELOT Xavier, PR M. BERGONIER Dominique, MC Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, PR Mme HAGEN-PICARD Nicole, PR M. NOUVEL Laurent-Xavier, MC Mme MILA Hanna, MC</p> <p><u>PATHOLOGIE DES RUMINANTS :</u> M. SCHELCHER François, PR M. FOUCRAS Gilles, PR M. CORBIERE Fabien, MC M. MAILLARD Renaud, MC M. MEYER Gilles, PR</p> <p><u>PRODUCTION ET PATHOLOGIE AVIAIRE ET PORCINE :</u> Mme WARET-SZKUTA Agnès, MC M. JOUGLAR Jean-Yves, MC M. GUERIN Jean-Luc, PR M. LE LOC'H Guillaume, MC</p> <p><u>PRODUCTIONS ANIMALES AMELIORATION GENETIQUE ECONOMIE :</u> M. DUCOS Alain, PR M. SANS Pierre, PR M. RABOISSON Didier, MC</p> | <p>Responsable : Mme GAYRARD</p> <p><u>ANATOMIE :</u> M. MOGICATO Giovanni, MC M. LIGNEREUX Yves, PR Mme DEVIERS Alexandra, MC</p> <p><u>ANATOMIE PATHOLOGIQUE - HISTOLOGIE :</u> M. DELVERDIER Maxence, PR Mme LETRON-RAYMOND Isabelle, MC Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, PR Mme LACROUX Caroline, PR</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle, MC</p> <p><u>MICROBIOLOGIE – IMMUNOLOGIE - MALADIES INFECTIEUSES :</u> M. MILON Alain, PR M. BERTAGNOLI Stéphane, PR M. VOLMER Romain, MC Mme BOULLIER Séverine, MC Mme DANIELS Héléne, MC</p> <p><u>BIOSTATISTIQUES :</u> M. CONCORDET Didier, PR M. LYAZRHI Faouzi, MC</p> <p><u>PHARMACIE-TOXICOLOGIE :</u> M. PETIT Claude, PR Mme CLAUW Martine, PR M. GUERRE Philippe, PR M. JAEG Philippe, MC</p> <p><u>PHYSIOLOGIE –PHARMACOLOGIE THERAPEUTIQUE :</u> M. BOUSQUET-MELOU Alain, PR Mme GAYRARD-TROY Véronique, PR Mme FERRAN Aude, MC M. LEFEBVRE Hervé, PR</p> <p><u>BIOCHIMIE :</u> Mme BENNIS-BRET Lydie, MC</p> <p><u>ANGLAIS :</u> M. SEVERAC Benoît, PLPA Mme MICHAUD Françoise, PCEA</p> | <p>Responsable : Mme CADIERGUES</p> <p><u>ANESTHESIOLOGIE</u> M. VERWAERDE Patrick, MC</p> <p><u>CHIRURGIE :</u> M. AUTEFAGE André, PR M. ASIMUS Erik, MC M. MATHON Didier, MC Mme MEYNAUD-COLLARD Patricia, MC Mme PALIERNE Sophie, MC</p> <p><u>MEDECINE INTERNE :</u> Mme DIQUELOU Armelle, MC M. DOSSIN Olivier, MC Mme LAVOUE Rachel, MC Mme GAILLARD-THOMAS Elodie, MCC</p> <p><u>OPHTALMOLOGIE :</u> M. DOUET Jean-Yves, MC</p> <p><u>DERMATOLOGIE :</u> Mme CADIERGUES Marie-Christine, PR</p> <p><u>IMAGERIE MEDICALE</u> M. CONCHOU Fabrice, MC</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme TRUMEL Catherine, PR</p> <p><u>PATHOLOGIE DES EQUIDES :</u> M. CUEVAS RAMOS Gabriel, MC Mme PRADIER Sophie, MC Mme LALLEMAND Elodie, AERC</p> |

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Patrice MASSIP,

Professeur de la faculté de Médecine de Toulouse III, Paul Sabatier
Praticien hospitalier en Maladies Infectieuses et Tropicales
Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse,
Hommages respectueux.

A Madame le Docteur Hélène DANIELS,

Maître de Conférences en Infectiologie à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Qui m'a fait l'honneur d'accepter de diriger cette thèse et m'a guidée tout au long de ce travail.
Merci pour votre disponibilité et vos conseils.

A Monsieur le Docteur Guillaume Le LOC'H,

Maître de Conférences en Médecine Zoologique à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Qui m'a fait l'honneur d'accepter de faire partie de ce jury.
Merci pour votre temps.

A Monsieur le Docteur Thierry JAUNIAUX,

Vétérinaire au département de morphologie et pathologie de l'Université vétérinaire de Liège,
Pour avoir partagé ses connaissances sur les mammifères marins et leur autopsie,
Pour m'avoir permis de réaliser cette thèse,
Qu'il trouve ici l'expression de mes sincères remerciements.

A Mutien-Marie Garigliany, Mathieu Franssen, Calixte Bayrou, Dominique Cassart, Etienne Levy, Michael Sarlet, Michel Jansen, Fran Garcia, et tous les autres membres de l'équipe du service de morphologie et de pathologie de l'Ulg,

Pour m'avoir accompagné pendant les 5 mois de la réalisation pratique de cette thèse et pour ces moments passés ensemble,
Merci beaucoup.

A David Fretin et Patrick Michel,

Pour leurs conseils sur les techniques de laboratoire et leur aide pour la création du témoin positif,
Un grand merci.

A Willy Dabin, Olivier Van Canneyt et tous les membres du Réseau National d'Echouage Français,

Pour la collaboration pour le transfert des mammifères marins échoués français,
Sincères remerciements.

« Le jour viendra où les personnes comme moi regarderont le meurtre des animaux comme ils regardent aujourd'hui le meurtre des êtres humains. »

« Va prendre tes leçons dans la nature, c'est là qu'est notre futur. »

Léonard de Vinci

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|-----|
| TABLE DES MATIERES..... | 9 |
| TABLE DES ILLUSTRATIONS..... | 11 |
| LISTE DES ABREVIATIONS | 17 |
| INTRODUCTION..... | 19 |
| 1. Le genre bactérien <i>Brucella</i> | 23 |
| 1.1. Historique et classification du genre <i>Brucella</i> | 23 |
| 1.2. Caractéristiques structurales et physiologiques..... | 24 |
| 1.3. Réservoir et Spectre d’hôte | 28 |
| 1.4. Pathogénicité et virulence | 29 |
| 1.5. Immunité anti- <i>Brucella</i> | 31 |
| 1.6. Clinique | 35 |
| 1.7. Traitement et prophylaxie | 36 |
| 2. La Brucellose chez les mammifères marins | 39 |
| 2.1. Caractérisation moléculaire des <i>Brucella</i> marines | 39 |
| 2.2. Les infections à <i>Brucella</i> chez les mammifères marins | 49 |
| 2.3. <i>Brucella</i> marines et autres espèces animales..... | 75 |
| 3. Problématique..... | 83 |
| 1. PARTIE 1 : Etude rétrospective des échouages et des causes de mortalité des mammifères marins sur les côtes françaises de la Manche de 1995 à 2015..... | 87 |
| 1.1. Matériel et Méthodes..... | 89 |
| 1.2. Particularité anatomique des cétacés..... | 95 |
| 1.3. Les cétacés..... | 96 |
| 1.4. Les Pinnipèdes..... | 112 |
| 1.5. Conclusion et discussion sur les échouages | 124 |

| | |
|--|-----|
| 2. PARTIE 2 : Etude de la Brucellose chez les Mammifères marins échoués sur les côtes françaises de la Manche de 1995 à 2015. | 133 |
| 2.1. Matériels et Méthodes | 134 |
| 2.2. Recherche de <i>Brucella spp.</i> par RT-PCR..... | 136 |
| 2.3. Etudes lésionnelles et immunohistochimiques des animaux positifs à <i>Brucella</i> en RT-PCR | 142 |
| 2.4. Séquençage de Sanger | 165 |
| 3. Conclusion et discussion sur la Brucellose marine | 169 |
| CONCLUSION GENERALE | 175 |

TABLE DES ILLUSTRATIONS

| | |
|---|----|
| Tableau 1: Caractéristiques phénotypiques des différentes espèces de <i>Brucella</i> (1)..... | 25 |
| Tableau 2: Caractéristiques phénotypiques des différentes espèces de <i>Brucella</i> (2)..... | 26 |
| Tableau 3 : Métabolisme oxydatif des <i>Brucella</i> | 27 |
| Tableau 4: Paramètres physico-chimiques de croissance des <i>Brucella</i> | 28 |
| Tableau 5: Répartition géographique, spectre d'hôte et potentiel zoonotique de différentes espèces de <i>Brucella</i> | 29 |
| Figure 1: Organisation génomique du locus <i>omp28</i> (<i>bp26</i>) de <i>Brucella melitensis</i> 16M et d'un isolat de phoque B2/94. | 40 |
| Figure 2: Empreintes génétiques de l' <i>IS711</i> de souches issues de mammifères marins et de souches de référence..... | 43 |
| Figure 3: Reconstruction phylogénétique des relations entre les séquences types (STs) des <i>Brucella</i> | 44 |
| Figure 4: Arbre phylogénique des <i>Brucella marines</i> obtenu par MLVA-16. | 46 |
| Figure 5: Schéma bilan des études moléculaires des espèces marines de <i>Brucella</i> | 48 |
| Tableau 6: Liste des espèces de mammifères marins chez lesquelles <i>Brucella</i> a été isolée ou détectée..... | 50 |
| Tableau 7: Espèces de mammifères marins chez lesquelles seuls des anticorps anti- <i>Brucella</i> ont été détectés. | 51 |
| Figure 6: Répartition géographique des cétacés séropositifs et infectés par la brucellose..... | 59 |
| Figure 7: Répartition géographique des pinnipèdes, loutres de mer et ours polaires séropositifs à <i>Brucella</i> | 59 |
| Figure 8: Ulcère longitudinal entre les deux nageoires pectorales chez un marsouin commun infecté par <i>Brucella ceti</i> | 61 |
| Figure 9: Testicule droit de marsouin commun infecté par <i>Brucella ceti</i> présentant un abcès proximal. | 63 |
| Figure 10: Infiltration des méninges chez un dauphin bleu et blanc du Costa Rica présentant une neurobrucellose..... | 64 |
| Figure 11: Nodule sur la valvule mitrale et vaisseaux hyperhémiques en zone dorsale de la valvule du cœur chez un dauphin bleu et blanc. | 65 |
| Figure 12: Arthrite de l'articulation atlanto-occipitale purulente et caséuse chez un dauphin commun à bec court. | 66 |

| | |
|---|-----|
| Figure 13: Immunohistochimie marquant un antigène de <i>Brucella</i> dans les cellules inflammatoires des villosités placentaires chez un dauphin x40..... | 71 |
| Figure 14: Coloration d'immunohistochimie positive dans les cellules phagocytaires sous la capsule de la rate chez un marsouin commun infecté par <i>Brucella ceti</i> x200. | 72 |
| Figure 15: Différenciation de toutes les espèces de <i>Brucella</i> et de leurs souches vaccinales S19, RB51 et Rev1 par la PCR multiplexe Bruceladder..... | 74 |
| Figure 16 : Distribution annuelle des effectifs d'échouages de cétacés sur le littoral français de 1980 à 2014 (n = 18 959). | 88 |
| Figure 17 : Distribution intra-annuelle des échouages de cétacés sur l'ensemble du littoral en 2014 (n=1 026). | 88 |
| Tableau 8: Cause de mortalité probable en fonction des lésions macroscopiques observées lors de l'autopsie d'un mammifère marin. | 92 |
| Tableau 9: Code de conservation en fonction des observations <i>post-mortem</i> | 93 |
| Tableau 10: Pertinence des échantillons en fonction du code de conservation de la carcasse. | 94 |
| Figure 18: Mesure de la longueur totale d'un marsouin commun. | 95 |
| Figure 19: Mesure de la longueur totale d'un pinnipède. | 95 |
| Figure 20: Estomac pluriloculé du dauphin d'après Harrison..... | 96 |
| Tableau 11 : Répartition annuelle des cas d'échouages de marsouins communs sur les côtes françaises de la Manche et parmi ceux-ci les animaux autopsiés à l'ULg..... | 97 |
| Figure 21: Répartition annuelle des cas d'échouages de marsouins communs sur les côtes françaises de la Manche et parmi ceux-ci les animaux autopsiés à l'ULg..... | 98 |
| Tableau 12 : Répartition saisonnière des marsouins communs échoués sur les côtes françaises de la Manche et autopsiés à l'ULg. | 98 |
| Figure 22: Répartition saisonnière des marsouins communs échoués sur les côtes françaises de la Manche et autopsiés à l'ULg..... | 99 |
| Tableau 13 : Catégories d'âge du marsouin commun en fonction de la longueur totale de l'animal..... | 100 |
| Figure 23: Répartition des marsouins communs échoués sur les côtes françaises de la Manche et autopsiés à l'ULg en termes de ratio sexe/âge. | 100 |
| Tableau 14 : Longueur totale, poids et épaisseur de lard des marsouins communs échoués sur les côtes françaises de la Manche et autopsiés à l'ULg. | 101 |
| Tableau 15 : Listing des causes de mortalité des marsouins communs échoués de 1995 à 2014 et nombre respectif d'animaux..... | 102 |

| | |
|--|-----|
| Figure 24: Répartition annuelle des 3 principales causes de mortalité des marsouins échoués sur les côtes françaises de la Manche et autopsiés à l'ULg. | 103 |
| Figure 25: Répartition saisonnière des 3 principales causes de mortalité des marsouins échoués sur les côtes françaises de la Manche et autopsiés à l'ULg..... | 103 |
| Figure 26: Distribution des animaux échoués suivant la cause de la mort et leur sexe. | 104 |
| Figure 27: Distribution des animaux échoués suivant la cause de la mort et leur catégorie d'âge. | 104 |
| Figure 28: Lésions observées à l'autopsie suivant les trois causes de mortalité principales des marsouins communs échoués sur les côtes françaises de la Manche et autopsiés à l'ULg (1). | 105 |
| Figure 29: Lésions observées à l'autopsie suivant les trois causes de mortalité principales des marsouins communs échoués sur les côtes françaises de la Manche et autopsiés à l'ULg (2). | 105 |
| Tableau 16 : Répartition annuelle des cas d'échouages de phoques communs sur les côtes françaises de la Manche et parmi ceux-ci les animaux autopsiés à l'ULg..... | 113 |
| Figure 30: Répartition annuelle des cas d'échouages de phoques communs sur les côtes françaises de la Manche et parmi ceux-ci les animaux autopsiés à l'ULg..... | 114 |
| Figure 31: Répartition saisonnière des phoques communs échoués sur les côtes françaises de la Manche et autopsiés à l'ULg..... | 115 |
| Figure 32: Répartition des phoques communs échoués sur les côtes françaises de la Manche et autopsiés à l'ULg en termes de ratio sexe/âge. | 116 |
| Tableau 17: Longueur, poids et épaisseur de lard des phoques communs échoués sur les côtes françaises de la Manche et autopsiés à l'ULg. | 116 |
| Tableau 18: Listing des causes de mortalité des phoques veaux-marins échoués et nombre respectif d'animaux..... | 117 |
| Figure 33: Répartition annuelle des 3 principales causes de mortalité des phoques veaux-marins échoués sur les côtes françaises de la Manche et autopsiés à l'ULg..... | 118 |
| Figure 34: Répartition saisonnière des 3 principales causes de mortalité des phoques communs échoués sur les côtes françaises de la Manche et autopsiés à l'ULg. | 119 |
| Figure 35: Distribution des phoques veaux-marins échoués suivant la cause de la mort et leur sexe..... | 119 |
| Figure 36: Distribution des phoques veaux-marins échoués suivant la cause de la mort et leur catégorie d'âge. | 120 |

| | |
|---|-----|
| Figure 37: Lésions observées à l'autopsie suivant les trois causes de mortalité principales des phoques veaux-marins échoués sur les côtes françaises de la Manche et autopsiés à l'ULg (1). | 121 |
| Figure 38: Lésions observées à l'autopsie suivant les trois causes de mortalité principales des phoques veaux-marins échoués sur les côtes françaises de la Manche et autopsiés à l'ULg (2). | 121 |
| Tableau 19 : Résultats de la RT-PCR pour les sept dilutions de la solution de génome de <i>Brucella ceti</i> B1/94..... | 137 |
| Figure 39: Droite de calibration de la RT-PCR..... | 138 |
| Tableau 20: Résultats de la RT-PCR pour des prélèvements des 60 mammifères marins testés. | 139 |
| Tableau 21: Résultats de la RT-PCR des organes testés en pool de trois mammifères marins positifs. | 141 |
| Tableau 22: Liste des organes testés par immunohistochimie pour chaque animal positif par RT-PCR..... | 142 |
| Figure 40: Coloration d'immunohistochimie sur la rate d'un marsouin échoué sur la côte belge en 2008 (témoin positif). | 144 |
| Figure 41: Pneumonie parenchymateuse subaiguë multifocale chez le marsouin A09/1438. | 146 |
| Figure 42: Hépatite chronique diffuse chez le marsouin A09/1438..... | 146 |
| Figure 43: Parasite dans le foie chez le marsouin A09/1438. | 147 |
| Figure 44: Coupe d'encéphale positive par immunohistochimie contre <i>Brucella spp.</i> chez le marsouin A09/1438. | 148 |
| Figure 45: Coupe de rate positive par immunohistochimie contre <i>Brucella spp.</i> chez le marsouin A09/1438. | 148 |
| Figure 46: Pneumonie interstitielle subaiguë sévère chez le marsouin A09/1943..... | 150 |
| Figure 47: Hépatite aiguë nécrosante multifocale chez le marsouin A09/1943..... | 151 |
| Figure 48: Coloration positive dans le cytoplasme de cellules de la rate chez le marsouin A09/1943. | 152 |
| Figure 49: Coloration positive focale dans le cytoplasme des cellules inflammatoires du nœud lymphatique préscapulaire chez le marsouin A09/1943. | 152 |
| Figure 50: Coloration suspecte dans une coupe de rein chez le marsouin A09/1943..... | 153 |
| Figure 51: Pneumonie granulomateuse chronique sévère chez le marsouin A13/1935..... | 155 |
| Figure 52: Coloration positive dans le cytoplasme de cellules de la rate chez le marsouin A13/1935..... | 156 |

| | |
|--|-----|
| Figure 53: Coloration positive dans le cytoplasme de cellules du nœud lymphatique préscapulaire chez le marsouin A13/1935. | 156 |
| Figure 54: Méningite avec épaissement et congestion des méninges chez le dauphin A13/1034. | 158 |
| Figure 55: Bronchite aiguë à chronique granulomateuse avec parfois obstruction bronchique chez le dauphin A13/1034. | 158 |
| Figure 56: Larves parasitaires dans le parenchyme pulmonaire chez le dauphin A13/1034. | 159 |
| Figure 57: Coloration positive dans le cytoplasme de cellules de type macrophages dans les méninges chez le dauphin A13/1034. | 160 |
| Figure 58: Poumon congestif, hémorragique et bronchopneumonie chez le phoque A13/316. | 162 |
| Figure 59: Nœud lymphatique cervical oedématié et non différencié chez le phoque A13/316. | 162 |
| Figure 60: Coloration positive de cellules de type macrophages dans le nœud lymphatique bronchique chez le phoque A13/316. | 163 |
| Figure 61: Coloration positive de cellules de type macrophages dans le nœud lymphatique bronchique chez le phoque A13/316. | 164 |
| Figure 62: Coloration suspecte dans une coupe du testicule chez le phoque A13/316. | 164 |
| Figure 63: Résultat de la PCR de la partie du gène <i>bcsp 31</i> (A), de la partie du gène <i>omp 25</i> (B) et résultats pour le phoque commun A13/316 (C). | 167 |
| Tableau 23: Résultats des expériences d'immunohistochimie par organe. | 172 |

LISTE DES ABREVIATIONS

γ GT : Gammaglutamyl-transférases

Ac : Anticorps

ADCC : Antibody dependant cell cytotoxicity

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AEC : 3-Amino-9-Ethylcarbazole

ASAT : Aspartate aminotransférase

cELISA : ELISA compétitive

CERVA : Centre d'Etude et de Recherches Vétérinaires et Agrochimiques

CITES : Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : Cellules protectrices d'antigène

Ct : Cycle seuil

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

iELISA : ELISA indirecte

IgG : Immunoglobuline G

gELISA : ELISA visant les IgG

HRP : Peroxydase de Raifort

kDa : kilodalton

LB : Lymphocyte B

LPS : Lipopolysaccharide

LT : Lymphocyte T

LTh1 : Lymphocyte T helper de type 1

LTh2 : Lymphocyte T helper de type 2

MARIN : Marine Animals Research and Intervention Network

MLSA : Multilocus Sequence Analysis

MLVA : Multiple Loci VNTR Analysis

Mpb : Méga paires de base

NC : Non communiqué

NCBI : National Center for Biotechnology Information

NK : Natural Killer

NLR : NOD-like receptor

OMP : Outer Membrane Protein

ORF : Phase ouverte de lecture

PAMP : Pathogen associated molecular pattern

pb : paire de base

PCR : Polymerase Chain Reaction

PCR-IRS : PCR-Interspersed repetitive sequence

PCR-RFLP : PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism

PRR : Pattern Recognition Receptor

RLR : Rig helicase-like receptor

RNE : Réseau National d'Echouage

RT-PCR : Real Time - Polymerase Chain Reaction

TLR : Toll-like receptor

UGMM: Unité de Gestion de Modèle Mathématique de la Mer du Nord

ULg : Université de Liège

VNTR : Variable Number of Tandem Repeats

INTRODUCTION

La brucellose est une maladie infectieuse contagieuse causée par des bactéries du genre *Brucella*, bien connues chez les animaux de rente et particulièrement les bovins. Les *Brucella* présentent un potentiel infectieux pour un grand nombre de mammifères terrestres mais aussi, découverte récente, pour les mammifères marins. Cette maladie est une anthroponose puisqu'elle peut être transmise à l'homme (hôte accidentel) par les espèces animales infectées.

La présence de cétacés et de pinnipèdes sur nos littoraux représente un bon bioindicateur de la qualité des eaux des océans, ces mammifères étant au sommet de la chaîne trophique. Leur présence permet également d'estimer l'impact des activités humaines sur les ressources marines et de mesurer l'utilité des mesures de protection mises en œuvre. Les activités humaines, et plus particulièrement la pêche intensive, réduisent les zones où la nourriture est présente, obligeant les mammifères marins à se regrouper pour se nourrir. Ces contacts étroits plutôt inhabituels, notamment chez les cétacés, facilitent la propagation de pathogènes tels que *Brucella* et entraînent une compétition pour les ressources pouvant causer une sous-nutrition et donc une susceptibilité augmentée aux infections. A ce titre, de nombreuses espèces menacées d'extinction d'après le CITES se sont récemment révélées infectées par des *Brucella* marines. La brucellose touchant principalement les organes reproducteurs, sa prévalence peut avoir un impact sur la dynamique des populations et présente donc un réel problème dans le contexte de la sauvegarde de ces espèces.

Le premier rapport d'infection de mammifères marins par la brucellose est récent. En 1994, quatre phoques veaux-marins, deux marsouins communs et un dauphin commun se sont échoués sur les côtes écossaises. Des bactéries appartenant au genre *Brucella* ont été isolées de tissus collectés lors de l'examen *post-mortem* des animaux (Ewalt *et al.*, 1994 ; Nymo *et al.*, 2011). La même année, un grand dauphin captif à San Diego, Californie, avorte. Une bactérie du genre *Brucella* est retrouvée dans les tissus de l'avorton (Ewalt *et al.*, 1994 ; Nymo *et al.*, 2011 ; Guzman-Verri *et al.*, 2012). Depuis ces premières descriptions, de plus en plus d'espèces de mammifères marins ont été découvertes infectées par des *Brucella* marines.

Le potentiel zoonotique de la brucellose soulève quant à lui la problématique des contacts étroits de plus en plus fréquents entre les mammifères marins et les humains. Ils peuvent prendre différentes formes : (i) les échouages (ii) les attractions touristiques (iii) certaines thérapies comportementales impliquant l'utilisation de dauphins. (iv) La consommation de viande de mammifères marins par certaines populations telles que les

Inuits, pour qui les phoques constituent un aliment de base. Cependant, ils ne sont pas les seuls susceptibles de se contaminer *via* l'ingestion de viande de mammifères marins. Selon Robards et Reeves (2011), la consommation de viande de mammifères marins est mondialement répandue. Depuis 1990, des personnes provenant d'au moins 114 pays ont consommé de la viande marine parmi 87 espèces (soit environ 2/3 du total des espèces de mammifères marins peuplant notre planète). La transmission de maladies zoonotiques par ces ressources est donc actuellement une vraie source d'inquiétude.

Dans ce contexte difficile, entre sauvegarde des espèces de mammifères marins et protection des populations humaines, les maladies infectieuses comme la brucellose, devraient être prises en compte dans les programmes de conservation. Néanmoins, la découverte de la brucellose marine étant récente, peu de données sont disponibles à son sujet. C'est la raison pour laquelle, dans la première partie de ce manuscrit, je présenterai des généralités sur les bactéries du genre *Brucella* à partir de ce qui est connu chez les *Brucella* des mammifères terrestres : taxonomie, morphologie et biologie, pathogénicité et traitement. Dans une deuxième partie, je m'attacherai à décrire les récentes avancées en termes de caractérisation des *Brucella* des mammifères marins, de leur épidémiologie et de la clinique qui leur est associée. Enfin, je présenterai et discuterai les résultats obtenus lors de mes travaux de thèse concernant les enquêtes épidémiologique et anatomo-pathologique réalisées sur les échouages de mammifères marins de 1995 à nos jours sur les côtes françaises de la Manche.

1. Le genre bactérien *Brucella*

1.1. Historique et classification du genre *Brucella*

Les bactéries du genre *Brucella* appartiennent à la famille des *Brucellaceae*, à l'ordre des *Rhizobiales* et à la classe des $\alpha 2$ -*Proteobacteria* (Markey *et al.*, 2013). Ce genre a été établi en 1920 par Meyer et Shaw, avec à l'époque deux espèces identifiées: *Brucella melitensis* chez l'homme et chez la chèvre, et *B.abortus* chez les bovins (Markey *et al.*, 2013). Suite à plusieurs études, l'agent pathogène responsable de la fièvre ondulante chez l'homme (appelée également fièvre de Malte) n'a pas pu être différencié morphologiquement ou biochimiquement de l'agent pathogène responsable d'avortements chez les animaux domestiques (Banai et Corbel, 2010). Par la suite, quatre autres espèces ont été décrites comme appartenant à ce genre : *B.suis* en 1929 chez le porc, *B.ovis* en 1956 chez les ovins, *B.neotomae* en 1957 isolé chez un petit rongeur de régions désertiques, et *B.canis* isolé chez les canidés en 1968 (Markey *et al.*, 2013). Cette classification est largement basée sur les caractères phénotypiques, les différences de pathogénicité et le spectre d'hôtes. L'apparition de méthodes moléculaires de plus en plus sophistiquées a permis de confirmer que ces espèces étaient phylogénétiquement très proches les unes des autres avec un pourcentage d'homologie de 90% (Banai et Corbel, 2010). Les séquences de leurs ARN ribosomique 16S sont identiques, de même que celles du gène *recA* qui code pour une protéine de réparation/recombinaison de l'ADN intervenant dans le cadre du système SOS (Banai et Corbel, 2010).

Jusqu'à 2007, ces six espèces constituaient les seules espèces de *Brucella* connues. Depuis, quatre autres espèces ont été incluses dans le genre: (i) *Brucella microti*, décrite en 2008, isolée d'un campagnol commun en République Tchèque puis de renards roux et du sol en Autriche (Markey *et al.*, 2013), (ii) *Brucella inopinata*, découverte chez une femme présentant des signes de brucellose (Markey *et al.*, 2013). La bactérie a été isolée de l'infection d'un implant mammaire chez cette patiente et représente à l'heure actuelle, l'espèce de *Brucella* la plus éloignée phénotypiquement des autres malgré une homologie avec *B.melitensis* supérieure à 80%. (iii) *B.ceti* et *B.pinnipedialis*, isolées chez des mammifères marins (cétacés et pinnipèdes, respectivement) et sur lesquelles ont porté mes travaux de thèse (Guzman-Verri *et al.*, 2012).

A ce jour, le genre *Brucella* regroupe donc dix espèces différentes mais certains auteurs soutiennent qu'il en reste encore à décrire (Wyatt *et al.*, 2013).

1.2. Caractéristiques structurales et physiologiques

1.2.1. Morphologie et structure

Les bactéries du genre *Brucella* sont des coccobacilles de petite taille : 0,5-0,7 µm x 0,6 - 1,5 µm (Banai et Corbel, 2010). Ce sont des bactéries GRAM négatives, non-capsulées, non sporulées et non mobiles. Ce sont des bactéries intracellulaires facultatives et sont capables d'infecter beaucoup d'espèces de mammifères à travers le monde (Banai et Corbel, 2010 ; Markey *et al.*, 2013).

Les *Brucella* sont en partie acido-résistantes puisqu'elles ne sont pas décolorées par l'acide acétique utilisé dans la coloration de Zielh-Nielsen modifiée. Ainsi, le carbolfuschine reste piégé dans les bactéries qui apparaissent alors rouges sur fond bleu. Toutefois, il convient de faire attention lors du diagnostic car d'autres bactéries telles que *Coxiella burnetii* ou les *Chlamydophila* peuvent aussi être révélées de cette manière (Markey *et al.*, 2013).

La présence ou non de l'antigène O au sein du lipopolysaccharide (LPS) des *Brucella* définit respectivement deux phénotypes de colonies : lisses (S pour smooth) ou rugueuses (R pour rough (Mancilla, 2016). Le phénotype S est associé à une virulence plus marquée, comme chez *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ceti* et *B. pinnipedialis* (Foster *et al.*, 2007 ; Guzman-Verri *et al.*, 2012). *Brucella ovis* et *Brucella canis*, en revanche, expriment naturellement un LPS tronqué de son antigène O, leur conférant un phénotype R et une virulence diminuée (Mancilla, 2016).

1.2.2. Biochimie

Les *Brucella* sont catalase positives, oxydase positives et uréase positives. Elles possèdent également une nitrate réductase (Foster *et al.*, 2007).

Les tableaux 1 et 2 qui suivent résument les caractéristiques de toutes les espèces de *Brucella* et de leurs biovars.

Tableau 1: Caractéristiques phénotypiques des différentes espèces de *Brucella* (1).

| Species | Colony Morphology ^b | Serum Requirement | Lysis by Phages ^a | | | | Oxidase | Urease Activity | Preferred Host | |
|------------------------|--------------------------------|-------------------|------------------------------|--------|-----|-----|---------|-----------------|----------------|----------------------------------|
| | | | Tb | Wb | Iz1 | R/C | | | | |
| | | | RTD ^c | 104RTD | RTD | RTD | RTD | | | |
| <i>B. abortus</i> | S | -d | + | + | + | + | - | +e | +f | Cattle and other Bovidae |
| <i>B. suis</i> | S | - | - | + | +g | +g | - | + | +h | Biovar 1: swine |
| | | | | | | | | | | Biovar 2: swine, hare |
| | | | | | | | | | | Biovar 3: swine |
| | | | | | | | | | | Biovar 4: reindeer |
| | | | | | | | | | | Biovar 5: wild rodents |
| <i>B. melitensis</i> | S | - | - | - | -i | + | - | + | +j | Sheep and goats |
| <i>B. neotomae</i> | S | - | - | + | + | + | - | - | +h | Desert wood rat ^l |
| <i>B. ovis</i> | R | + | - | - | - | - | + | - | - | Rams |
| <i>B. canis</i> | R | - | - | - | - | - | + | + | +h | Dogs |
| <i>B. ceti</i> | S | | +m | | +n | +o | - | + | + | Cetaceans |
| <i>B. pinnipedalis</i> | S | | +m | | +n | +o | - | + | + | Pinnipeds |
| <i>B. microti</i> | S | - | - | + | + | | | + | + | Vole (<i>Microtus arvalis</i>) |
| <i>B. inopinata</i> | S | - | P | | | | | - | + | (fast) ? |

a. Phages: Tbilisi (Tb), Weybridge (Wb), Izatnagar1(Iz1) and R/C; **b.** Morphologie des colonies: S: smooth (lisse), R: rough (rugueux); **c.** RTD: test de dilution de routine; **d.** *Brucella abortus* biovar 2 a généralement besoin de sérum pour la croissance; **e.** Quelques isolats africains de *B. abortus* biovar 3 sont négatifs; **f.** Taux intermédiaire, sauf la souche 544 et quelques souches qui sont négatives; **g.** Quelques isolats de *B. suis* biovar 2 ne sont pas partiellement lysés par les phages Wb or Iz1; **h.** Taux rapide; **i.** Quelques isolats sont lysés par le phage W; **j.** Taux faible sauf quelques souches qui ont un taux rapide; **l.** *Neotoma lepida*; **m.** Quelques isolats sont lysés par le phage Tb; **n.** La plupart des isolats sont lysés par le phage Wb; **o.** La plupart des isolats est lysée par le phage Iz; **p.** Lyse incomplète avec les phages Tb, F1 et F2; (d'après Banai et Corbel, 2010).

Tableau 2: Caractéristiques phénotypiques des différentes espèces de *Brucella* (2).

| Species | Biovar | CO ₂ Requirement | H ₂ S Production | Growth on Dyes ^a | | Agglutination with Monospecific Sera | | |
|-------------------------|--------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------|--------------------------------------|----|---|
| | | | | Thionin | Basic Fuchsin | A | M | R |
| <i>B. melitensis</i> | 1 | - | - | +d | + | - | + | - |
| | 2 | - | - | + | + | + | - | - |
| | 3 | - | - | + | + | + | + | - |
| <i>B. abortus</i> | 1 | +b | + | - | + | + | - | - |
| | 2 | +b | + | - | - | + | - | - |
| | 3 | +b | + | + | + | + | - | - |
| | 4 | +b | + | - | +c | - | + | - |
| | 5 | - | - | + | + | - | + | - |
| | 6 | - | - | + | + | + | - | - |
| | 9 | + or - | + | + | + | - | + | - |
| <i>B. suis</i> | 1 | - | + | + | -e | + | - | - |
| | 2 | - | - | + | - | + | - | - |
| | 3 | - | - | + | + | + | - | - |
| | 4 | - | - | + | -f | + | + | - |
| | 5 | - | - | - | - | - | + | - |
| <i>B. neotomae</i> | - | - | + | -g | - | + | - | - |
| <i>B. ovis</i> | - | + | - | + | -f | - | - | + |
| <i>B. canis</i> | - | - | - | + | -f | - | - | + |
| <i>B. ceti</i> | - | - | - | +d | + | + | -f | - |
| <i>B. pinnipedialis</i> | - | + | - | + | + | + | -f | - |
| <i>B. microti</i> | - | - | - | + | + | - | + | - |
| <i>B. inopinata</i> | - | - | + | + | + | - | + | - |

a. Concentration en colorant dans le milieu sérum dextrose: 20 µg/mL ; **b.** Habituellement positif sur premier isolement ; **c.** Certaines souches sensibles à la fuschine basique ont été isolées ; **d.** Certaines souches sont inhibées par les colorants ; **e.** Certaines souches résistantes à la fuschine basique ont été isolées ; **f.** Négatif pour la plupart des souches ; **g.** Croissance à une concentration de thionine de 10 µg/ml ;(d'après Banai et Corbel, 2010).

Les *Brucella* de mammifères marins ne produisent pas de sulfure d'hydrogène, H₂S. En ce qui concerne la lyse par les bactériophages, les *Brucella* marines sont, pour la plupart des souches, lysées par Tsibili, Weybridge et Izatnagar mais sont résistantes au phage R/C. De plus, elles ne s'agglutinent qu'avec le sérum monospécifique anti-A. Leur croissance est possible en présence de fuschine basique et de thionine.

Les souches issues des pinnipèdes sont capnophiles c'est-à-dire qu'elles ont besoin de dioxyde de carbone pour leur croissance alors que les souches issues de cétacés ne le sont pas (Banai et Corbel, 2010 ; Foster *et al.*, 2007 ; Guzman-Verri *et al.*, 2012).

En ce qui concerne le métabolisme oxydatif, comme le montre le tableau 3, les souches issues de cétacés sont capables de métaboliser le D-galactose contrairement aux souches provenant de pinnipèdes (Jahans *et al.*, 1997 ; Jacques *et al.*, 2006).

Tableau 3 : Métabolisme oxydatif des *Brucella*.

| | L-glutamine | L-alanine | Asparagine | Arginine | DL-ornithine | L-lysine | L-arabinose | D-galactose | D-ribose | Xylose | Erythrine |
|---|-------------|-----------|------------|----------|--------------|----------|-------------|-------------|----------|--------|-----------|
| <i>B.pinnipedialis</i> | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + |
| <i>B.ceti</i> (marsouins, baleines, dauphins) | + | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + |
| <i>B.ceti</i> (dauphins) | + | - | - | - | - | - | + | + | + | + | - |
| <i>B.abortus</i> | + | + | + | - | - | - | + | + | + | - | + |
| <i>B.melitensis</i> | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + |
| <i>B.suis</i> biovars 1, 2 | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| <i>B.suis</i> biovars 3,4,5 <i>B.canis</i> | + | - | - | + | + | - | - | - | - | - | + |
| <i>B.ovis</i> | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |

(d'après Jacques *et al.*, 2006)

1.2.3. *Croissance*

Les *Brucella* sont des bactéries aérobies strictes, mais certaines souches nécessitent une atmosphère enrichie en CO₂ (5 à 10 %) pour leur croissance (Markey *et al.*, 2013). Le tableau 4 présente les conditions nécessaires pour la croissance de la bactérie. Seule *Brucella ovis* nécessite du sérum pour sa croissance (Banai et Corbel, 2010).

Tableau 4: Paramètres physico-chimiques de croissance des *Brucella*.

| | Croissance optimale | Extrêmes |
|-----------------|---------------------|----------|
| Température | 34 °C | 20-40°C |
| pH | 6,6-7,4 | 5,8-8,7 |
| NaCl | 0,4% | 4% |
| CO ₂ | 5-10% | |

(d'après Markey *et al.*, 2013)

1.2.4. *Organisation génomique*

Le génome de *Brucella* est composé de deux chromosomes circulaires d'approximativement 2,1 et 1,2 Mpb sauf *B.suis* biovar 3 qui possède un seul chromosome (Markey *et al.*, 2013).

Les différentes espèces de *Brucella* sont phylogénétiquement proches puisque le pourcentage d'homologie est de 90% (Banai et Corbel, 2010 ; Markey *et al.*, 2013). Cette homologie rend plus difficile le développement de méthodes moléculaires pour l'identification spécifique de chaque espèce (Laflèche *et al.*, 2006).

1.3. **Réservoir et Spectre d'hôte**

Les animaux d'élevage sont les principaux réservoirs de la brucellose mais certaines espèces de *Brucella* peuvent également infecter des mammifères sauvages et marins. La pathogénicité de la bactérie varie en fonction des espèces. Le tableau 5 présente les différents réservoirs animaux ainsi que la pathogénicité pour l'Homme.

Tableau 5: Répartition géographique, spectre d'hôte et potentiel zoonotique de différentes espèces de *Brucella*.

| Espèce | Biovars | Répartition | Hôte animal | Pathogénicité à l'Homme |
|-------------------------------|---------------------|---|----------------------------------|-------------------------|
| <i>Brucella abortus</i> | 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 | Ubiquitaire | Bovins, ongulés sauvages | Modérée |
| <i>Brucella melitensis</i> | 1, 2, 3 | Bassin méditerranéen, Moyen Orient | Ovins, caprins, ongulés sauvages | Forte |
| <i>Brucella suis</i> | 1, 3 | Amérique, Asie, Océanie | Suidés | Forte |
| <i>Brucella suis</i> | 2 | Europe centrale et occidentale | Suidés, lièvres | Faible |
| <i>Brucella suis</i> | 4 | Amérique du Nord, Russie | Rennes | Modérée |
| <i>Brucella suis</i> | 5 | Russie | Rongeurs sauvages | Forte |
| <i>Brucella canis</i> | | Ubiquitaire (fréquence élevée en Amérique du Sud) | Chiens | Faible |
| <i>Brucella ovis</i> | | Bassin méditerranéen | Ovins | Nulle |
| <i>Brucella neotomae</i> | | Utah (Etats-Unis) | Rongeurs du désert | Inconnue |
| <i>Brucella ceti</i> | | ? | Cétacés | A l'étude |
| <i>Brucella pinnipedialis</i> | | ? | Pinnipèdes | A l'étude |

(d'après Maurin, 2005)

1.4. Pathogénicité et virulence

Brucella est une bactérie intracellulaire facultative du système réticuloendothélial, elle se multiplie préférentiellement au sein des macrophages, des cellules dendritiques et des cellules trophoblastiques du placenta (Martirosyan *et al.*, 2011). Sa virulence dépend grandement de la souche et de la dose d'inoculation. La pathogénie varie également selon l'espèce hôte et l'individu (le statut reproducteur est prépondérant). En conséquence, tous les

degrés d'atteinte intermédiaire sont observés sur le terrain, de l'absence de signes cliniques à l'infection aiguë et sévère.

Les *Brucella* possèdent un développement intracellulaire facultatif (Markey *et al.*, 2013). Elles ont mis en place des mécanismes de défenses leur permettant de contourner la réponse immunitaire de l'hôte (Poester *et al.*, 2013). L'infection peut se faire par les muqueuses respiratoires ou digestives. Les bactéries envahissent alors les cellules épithéliales comme les cellules M des plaques de Peyer (Poester *et al.*, 2013). Une fois dans l'organisme, elles peuvent survivre dans n'importe quelle cellule. Elles échappent à la phagocytose par les macrophages dans lesquels elles se multiplient sans provoquer leur destruction (Poester *et al.*, 2013). En effet, elles empêchent la fusion phagolysosomale et peuvent inhiber l'apoptose des macrophages et se diriger vers un compartiment du réticulum endoplasmique rugueux (RER) propice à la réplication des *Brucella* (Poester *et al.*, 2013). Les *Brucella*, notamment *B. abortus*, possèdent un fort tropisme pour les cellules trophoblastiques dans lesquelles elles se multiplient intensément (De Figueiredo *et al.*, 2015). L'érythritol, un alcool à quatre carbones présent naturellement dans les eaux fœtales des ruminants, serait une source privilégiée de carbone pour les *Brucella*, favorisant ainsi leur croissance au niveau de l'utérus (Poester *et al.*, 2013). Ces bactéries entraînent alors des ulcères de l'endomètre, des placentites et la destruction des villosités, causant la mort et l'expulsion du fœtus (De Figueiredo *et al.*, 2015). Ces cocobacilles colonisent également les cotylédons, le chorion, les poumons du fœtus et les fluides fœtaux au cours du dernier tiers de gestation chez les ruminants. Le fœtus expulsé présente souvent des lésions de pleuropneumonie (De Figueiredo *et al.*, 2015). L'internalisation des *Brucella* dans les cellules de l'organisme est possible grâce aux protéines bactériennes BvrR (*Brucella* virulence related regulatory protein) et BvrS (*Brucella* virulence related sensory protein) (Carvalho-Nota *et al.*, 2010). Celles-ci permettent l'expression de protéines de la membrane externe qui facilitent l'internalisation des bactéries par modification du cytosquelette de la cellule hôte (Carvalho-Nota *et al.*, 2010). L'invasion par la muqueuse digestive n'entraîne pas de réaction inflammatoire (Poester *et al.*, 2013). Les *Brucella* présentent des mécanismes inhibant l'activation du système immunitaire, la sécrétion des cytokines ainsi que la présentation des antigènes. Le LPS, malgré son activité endotoxinique relativement faible, joue un rôle important. Il prévient l'action du complément et permet une résistance contre les peptides antimicrobiens comme les défensines et les lactoferrines (Poester *et al.*, 2013). En effet, les *Brucella* possèdent une enveloppe hydrophobe constituée de nombreuses molécules peu chargées négativement (Martirosyan *et*

al., 2011), les rendants insensibles aux peptides antimicrobiens cationiques de l'hôte. Les *Brucella* ne possèdent pas de capsule, de fimbriae ou d'exotoxines (Godfroid *et al.*, 2014). En revanche, le système de sécrétion de type IV codé par l'opéron *virB* est indispensable pour la survie des bactéries dans le milieu intracellulaire (Poester *et al.*, 2013). L'expression de l'opéron *virB* est activée en milieu acide (Carvalho-Nota *et al.*, 2010) et entraîne la neutralisation du pH du phagosome, permettant ainsi la survie des bactéries. Enfin, d'autres gènes sont exprimés afin d'empêcher la maturation et la fusion du phagosome avec le lysosome (Carvalho-Nota *et al.*, 2010). Cette dernière est également empêchée par le glucane cyclique β -1,2, protéine de la membrane externe (Carvalho-Nota *et al.*, 2010). Les mécanismes de virulence des *Brucella* ne sont pas encore tous connus.

1.5. Immunité anti-*Brucella*

1.5.1. Rappels

Lors de l'entrée d'une bactérie dans l'organisme, celle-ci est tout d'abord reconnue par les cellules résidentes, notamment les macrophages et les cellules dendritiques, grâce à des récepteurs de motifs microbiens conservés, appelés PRR (*e.g* C3R, pentraxines, TLR, RLR, NLR). L'engagement de ces récepteurs avec leurs ligands, les PAMPs (pour Pathogen associated Molecular Pattern), induit l'internalisation de la bactérie au sein d'une vacuole appelée phagosome et le déclenchement de la réponse inflammatoire grâce à la sécrétion de médiateurs chimiques, les cytokines. La réponse inflammatoire permet le recrutement, au site de l'infection, de nouveaux effecteurs de l'immunité innée, tels que les polynucléaires neutrophiles et les monocytes sanguins qui combattent le pathogène de manière non-spécifique. Parallèlement, les phagocytes (macrophages et cellules dendritiques) ayant internalisé la bactérie migrent vers le noeud lymphatique le plus proche afin d'activer l'immunité adaptative. Pour ce faire, ils doivent digérer la bactérie et présenter ses antigènes aux lymphocytes T (LT) dans le contexte du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Ces cellules sont qualifiées CPA (Cellules présentatrices d'antigène) professionnelles. La destruction de la bactérie internalisée par les CPA a lieu lors de la fusion du phagosome avec les lysosomes, vacuoles contenant de nombreux éléments bactéricides qui permettront la destruction et la digestion du pathogène de manière dépendante ou non des radicaux libres. Selon la nature des antigènes bactériens, ceux-ci seront apprêtés dans le contexte du CMH de classe I ou II et présentés aux LT CD8⁺ ou CD4⁺ helpers, respectivement. La reconnaissance spécifique entre l'antigène présenté par la CPA et un clone de LT entraînera sa sélection et sa

prolifération. Les rôles des LT matures activés sont multiples. Certains, comme les LT CD4+ helpers de type 1 (LTh1), vont favoriser la réponse à médiation cellulaire basée sur l'intervention des LT CD8+ cytotoxiques, très importants dans la lutte contre les pathogènes intracellulaires. D'autres, comme les LTh2, favoriseront plutôt la réponse à médiation humorale, *via* la production d'anticorps par les lymphocytes B (LB) différenciés en plasmocytes. Contre les pathogènes intracellulaires, les anticorps peuvent engendrer une protection *via* les phénomènes de neutralisation et d'ADCC (Antibody-dependant cell cytotoxicity) impliquant les cellules NK. Il existe bien d'autre type de LTh que je n'aborderai pas ici.

1.5.2. *Contournement du système immunitaire par Brucella*

Comme la plupart des pathogènes, les bactéries du genre *Brucella* ont mis en place un vaste panel de stratégies leur permettant de détourner la réponse immunitaire à leur avantage et donc de survivre chez leur hôte.

a) Reconnaissance PRR-PAMP et induction de la réponse inflammatoire :

Les cellules épithéliales constituent la principale porte d'entrée des *Brucella* dans l'organisme (Poester *et al.*, 2013). Contrairement aux autres bactéries intracellulaires, l'entrée de ces bactéries dans ces cellules épithéliales n'entraîne pas d'altérations cellulaires suffisantes au déclenchement d'une réaction inflammatoire (Skendros *et al.*, 2013).

Le LPS des *Brucella* n'induit qu'une faible activation du récepteur toll-like receptor 4 (TLR4), contrairement aux LPS des autres bactéries Gram négatives (De Figueiredo *et al.*, 2015). La production de facteurs pro-inflammatoires et l'activation du complément sont faibles (Skendros *et al.*, 2013).

Il semblerait que le récepteur TLR 9 associé à l'adaptateur MyD88 ait un rôle important dans la résistance de l'hôte à la brucellose puisqu'il est requis dans l'élimination de *B. abortus* et de *B. melitensis* dans les macrophages et les cellules dendritiques (De Figueiredo *et al.*, 2015). Cette observation est cohérente avec la physiologie des *Brucella* puisque le récepteur TLR 9 est intracellulaire, exprimé au niveau des endosomes et des lysosomes. Il est capable de détecter les ADN bactériens riches en motifs CpG entraînant la production d'interleukine-12 (IL-12), qui déclenche la réponse immunitaire par les lymphocytes T Th1 (De Figueiredo *et al.*, 2015).

b) Phagocytose :

Les *Brucella* reconnues par les CPA grâce à l'interaction PRR-PAMP sont internalisées grâce à un système de phagocytose de type « fermeture à glissières » (De Figueiredo *et al.*, 2015). Ce mécanisme nécessite l'intervention des microfilaments d'actine et des lipides membranaires. L'antigène O du LPS lisse des *Brucella* interagit avec les lipides de la membrane cytoplasmique des macrophages. Ce phénomène permet l'internalisation des bactéries et la formation de vacuoles particulières contenant les *Brucella* (BCV : *Brucella*-containing vacuoles) (De Figueiredo *et al.*, 2015). A ce stade environ 90% des bactéries meurent mais quelques-unes survivent dans les BCV (De Figueiredo *et al.*, 2015).

Les *Brucella* possèdent la capacité de minimiser la fusion des BCV avec les lysosomes, réduisant leur exposition aux facteurs bactéricides présents dans ces compartiments. Comme évoqué précédemment (cf §1.3 Pathogénicité et virulence), le β -glucane cyclique intervient dans ce phénomène (Carvalho-Nota *et al.*, 2010). Le LPS permet également d'empêcher la fusion des vacuoles avec le lysosome. En effet, les LPS libérés dans le milieu intracellulaire forment des micelles qui interagissent avec la membrane des BCV et modifient leur structure moléculaire (De Figueiredo *et al.*, 2015). Cette nouvelle composition ne permet alors pas leur fusion avec le lysosome. De manière intéressante, les *Brucella* font partie des rares bactéries à posséder une phosphatidylcholine dans leur membrane, lipoprotéine retrouvée classiquement chez les eucaryotes (De Figueiredo *et al.*, 2015). Lorsqu'une mutation est effectuée au niveau de la phosphatidylcholine-synthase, la fusion avec le lysosome n'est plus inhibée (De Figueiredo *et al.*, 2015). Cette protéine eucaryote semble servir de « couverture » aux *Brucella* pour se cacher dans la cellule hôte (Skendros *et al.*, 2013 ; De Figueiredo *et al.*, 2015).

Afin de s'adapter à leur environnement intracellulaire, les *Brucella* sont capables de remodeler leur enveloppe et de modifier leur métabolisme. Pour ce faire, elles expriment certains gènes leur permettant de survivre et de proliférer au sein des BCV, tel que l'opéron *virB*, activé à pH acide, permettant la neutralisation du pH des vacuoles (cf §1.3 Pathogénicité et Virulence).

c) CPA et présentation d'antigènes :

Les *Brucella* inhibent l'apoptose des macrophages et la maturation des cellules dendritiques, prolongeant leur la durée de vie (De Figueiredo *et al.*, 2015). De plus, elles ne

sécrètent pas de substances toxiques pour leur cellule hôte, comme des endotoxines, et n'envahissent pas leur noyau (Poester *et al.*, 2013). En préservant les CPA hôtes, ces bactéries augmentent leurs chances d'atteindre les nœuds lymphatiques, la rate et le foie et donc de se disséminer dans tout l'organisme.

De plus, les *Brucella* interfèrent avec le fonctionnement des cellules dendritiques en inhibant leur maturation par l'intermédiaire de la protéine bactérienne TcpB (De Figueiredo *et al.*, 2015). Cette inhibition est associée à un faible nombre de CMH de type II présents à la surface de ces cellules. Les cellules dendritiques infectées sécrètent alors une faible quantité d'IL-12 et de facteurs de nécrose tumorale α (TNF α) (De Figueiredo *et al.*, 2015).

Pour finir, le LPS des *Brucella* est difficilement dégradable par les macrophages (De Figueiredo *et al.*, 2015). Il forme alors des complexes avec les CMH-II réduisant leur activité.

d) La réponse adaptative à médiation humorale :

Lorsqu'un bovin est infecté par *Brucella abortus*, la réponse humorale se met en place, déclenchant la production précoce d'IgM. Cette synthèse dépend de la voie de contamination, de la quantité de bactéries infectantes et de l'état de santé de l'individu. La production d'IgG se met ensuite en place, suivie de la production d'IgA (Skendros *et al.*, 2013). La réponse anticorps se fait principalement contre le LPS des *Brucella* par production d'IgG3 et IgG2a spécifiques (Skendros *et al.*, 2013). Du point de vue de l'infection, ces anticorps ne sont pas protecteurs et sont uniquement utilisés à des fins diagnostiques.

e) La réponse adaptative à médiation cellulaire :

L'IFN γ et l'IL-12 sont deux cytokines majeures de la réponse à médiation cellulaire. Elles sont notamment sécrétées par les LTh1, permettant l'activation des LT CD8+ cytotoxiques qui sécréteront à leur tour de l'IFN γ et iront détruire les cellules infectées. Les antigènes des *Brucella* induisent majoritairement la production de cytokines orientant la réponse immunitaire vers une réponse de type T helper 1 (Th1), ce qui est cohérent avec leur mode de vie intracellulaire. Malheureusement, les *Brucella* sont capables d'inhiber la réponse des lymphocytes T CD8+ grâce à une protéine.

En conclusion, les *Brucella* pathogènes de mammifères terrestres sont capables d'échapper au système immunitaire par différents moyens, pas toujours élucidés. Concernant la pathogénie de la brucellose chez les mammifères marins, elle n'a jamais été investiguée.

1.6. Clinique

L'infection par les *Brucella* se décompose en deux périodes : la période primaire, qui correspond à l'infection aiguë, et la période secondaire qui correspond à l'infection chronique (Gagnière *et al.*, 2012 ; Poester *et al.*, 2013).

1.6.1. *La période primaire*

La contamination peut se faire par voie cutanée, surtout si la peau est lésée, ou par les muqueuses, notamment l'oropharynx, la conjonctive, les voies respiratoires supérieures, les voies orale, vaginale et digestive (Gagnière *et al.*, 2012). Une fois dans l'organisme, les bactéries sont phagocytées puis véhiculées par voie lymphatique par les macrophages jusqu'aux nœuds lymphatiques drainant le territoire d'entrée (Gagnière *et al.*, 2012). Les bactéries se multiplient activement au sein des macrophages pendant toute la migration mais aussi dans le nœud lymphatique. Cette **phase locorégionale** représente le premier relai ganglionnaire et la phase d'incubation de la maladie (Gagnière *et al.*, 2012). Lors de cette phase, le diagnostic de la maladie n'est possible que par sérologie (au-delà de deux semaines).

Après 1 à 3 semaines, le macrophage est lysé par effet cytopathique, libérant les bactéries qui sont alors disséminées par voie lymphatique et sanguine vers des localisations secondaires. A ce stade, il est parfois possible de mettre en évidence une phase de bactériémie (Gagnière *et al.*, 2012). La **phase de dissémination** est asymptomatique chez les ruminants et associée à de la fièvre chez l'homme. Elle permet aux *Brucella* de gagner des sites secondaires. Dans ces localisations secondaires, la multiplication intense des bactéries va à nouveau conduire à la lyse des macrophages, induisant une nouvelle phase de dissémination. C'est la répétition des cycles de multiplication-dissémination qui est à l'origine de la fièvre sudoro-algique (ondulante) chez l'homme. La durée de la période primaire et donc le nombre de cycles sont variables en fonction des espèces. L'issue de la période primaire est généralement l'entrée en période chronique bien qu'il ait été observée, dans de très rares cas, une guérison avec élimination des bactéries si l'animal possède un bon système immunitaire.

Les localisations secondaires préférentielles de *Brucella* sont : le système réticulo-endothélial, notamment la rate, les nœuds lymphatiques et le foie, les testicules et leurs annexes, l'utérus gravide, plus précisément au niveau du placenta mais également la mamelle où elles sont excrétées dans le lait, les articulations, les bourses séreuses et synoviales (Gagnière *et al.*, 2012 ; Poester *et al.*, 2013). Ainsi en fonction du lieu de multiplication de la

bactérie, différents tableaux cliniques peuvent être observés comme des avortements, des orchites, des arthrites... Les *Brucella* se multiplient notamment au niveau de l'espace utéro-chorial provoquant une placentite exsudative et nécrotique (De Figueiredo *et al.*, 2015). Ceci entraîne un décollement utéro-chorial et la formation d'adhérences fibreuses entre le placenta et l'utérus. Si ces lésions sont étendues, les échanges nutritifs entre la mère et le fœtus sont arrêtés et celui-ci meurt d'anoxie, déclenchant l'avortement (De Figueiredo *et al.*, 2015). Les *Brucella* peuvent également passer dans le liquide amniotique. Dans ce cas, le fœtus les ingère provoquant une septicémie et la mort du fœtus, et donc un avortement. Si les lésions placentaires sont peu étendues, le fœtus peut survivre et naître à terme ou prématurément. L'avortement peut survenir quelques semaines à quelques mois après l'infection pendant la gestation (Poester *et al.*, 2013). Par la suite, la femelle ayant avorté peut présenter une endométrite et des problèmes d'infécondité. En général, une vache infectée n'avorte qu'une seule fois. L'éradication de tous les gîtes microbiens est impossible. Les foyers bactériens ostéo-articulaires, neuro-méningés, abcès à centre caséifié du foie, de la rate et des reins présentent une évolution torpide.

1.6.2. *La période chronique*

La période chronique peut prendre deux formes : (i) l'établissement d'une infection chronique avec des signes cliniques associés, (ii) une infection latente asymptomatique, fréquemment rencontrée chez la vache, avec persistance de bactéries dans les macrophages dans les nœuds lymphatiques particulièrement ceux de l'appareil génital et de la mamelle procurant ainsi la possibilité de réactivation après plusieurs années (Gagnière *et al.*, 2012). Les signaux de réactivation sont encore inconnus.

1.7. **Traitement et prophylaxie**

1.7.1. *Traitement*

In vitro, les *Brucella* sont sensibles aux cyclines, aux aminosides, au cotrimoxazole et à la rifampicine (Chakroun, 2007). Néanmoins, chez l'hôte, leur physiopathologie (bactéries intracellulaires s'établissant au sein de nœuds lymphatiques parfois sous forme quiescente) peut les rendre insensibles à l'antibiothérapie. Cette maladie étant une zoonose grave, le traitement est donc interdit chez l'animal et l'abattage est systématique (cf paragraphe 1.5.2 sur la prophylaxie sanitaire).

Chez, l'homme le traitement est possible durant les phases précoces de l'infection uniquement. Plusieurs molécules possédant une bonne pénétration intracellulaire peuvent être associées sur une durée variable en fonction du stade de la maladie. Lors de la phase aiguë, exprimée la plupart du temps par une fièvre sudoro-algique, une bithérapie est mise en place à base de doxycycline et rifampicine ou doxycycline et streptomycine pendant six semaines. En l'absence de traitement ou lorsque celui-ci a été insuffisant, la maladie progresse et rentre en phase focalisée subaiguë. Il y a constitution de foyers infectieux isolés ou multiples, majoritairement ostéoarticulaires et, dans une moindre mesure, neurologiques, hépatiques, génitaux ou cardiaques. Des signes cliniques de type arthrite, méningite ou orchite peuvent apparaître. La nature du traitement de la brucellose focalisée est indentique à celui de la brucellose aiguë mais dure de trois à quatre mois. Dans certains cas, on peut avoir recours à une trithérapie à base de doxycycline, rifampicine et gentamicine. L'antibiothérapie en phase chronique est illusoire, les bactéries étant devenues inaccessibles. On se contente souvent d'un traitement symptomatique, d'une antigéno-thérapie (injection d'extrait d'enveloppe bactérienne) pour activer le système immunitaire et parfois d'une exérèse des foyers infectieux. Chez les mammifères marins, un seul traitement combinant des molécules utilisés en humaine a été testé et a permis une amélioration clinique de l'animal (Cassle *et al.*, 2013).

1.7.2. *Prophylaxies sanitaire et médicale*

La brucellose ovine et caprine – quelque soit sa forme – ainsi que la brucellose bovine abortive appartiennent à la liste des dangers sanitaires de première catégorie du fait de leurs conséquences économiques et du risque zoonotique qu'elles représentent. En France, au début des années 1970, lors de la mise en place de la réglementation sanitaire stricte concernant cette maladie, certains animaux furent vaccinés. Néanmoins, si les vaccins vivants atténués semblaient limiter efficacement l'excrétion, ils ne prévenaient pas l'infection et rendaient les animaux vaccinés indifférenciables des animaux infectés lors des tests de dépistage. C'est pourquoi, la vaccination vis-à-vis de la brucellose est aujourd'hui interdite en France et la prophylaxie concernant cette maladie n'est plus que sanitaire. Pour chaque avortement de bovin, un test de dépistage de la brucellose doit être obligatoirement effectué. Pour les petits ruminants, à partir de trois avortements en une semaine ou moins d'intervalle, une déclaration doit être réalisée avec prélèvements et analyses. Il est conseillé aux éleveurs de n'introduire dans leur troupeau que des animaux provenant de cheptels présentant des garanties sanitaires, en les plaçant sous quarantaine à leur arrivée. Un contrôle sérologique systématique des

animaux d'élevage doit être réalisé. Les animaux séropositifs sont abattus. Une hygiène particulière des locaux et au niveau de la reproduction est recommandée. Les femelles en parturition ou avortant doivent être isolées et les placentas et autres produits de la mise bas doivent être éliminés. Enfin, pour prévenir la contamination à l'Homme, le lait consommé doit être préférentiellement pasteurisé.

En conclusion, les connaissances sur la brucellose sont très majoritairement basées sur les données accumulées depuis des décennies chez les mammifères terrestres. En 1994, les mises en culture d'organes de cétacés et de pinnipèdes ainsi que de ceux d'un avorton ont révélé la présence de bactéries du genre *Brucella*, correspondant à une nouvelle espèce du genre et à une première description de brucellose chez les mammifères marins. Ainsi, dans la partie qui suit, je développerai les quelques données acquises depuis ces vingt dernières années sur la brucellose chez les mammifères marins.

2. La Brucellose chez les mammifères marins

Nous allons tout d'abord nous intéresser à la classification des souches de *Brucella* chez les mammifères marins. Par la suite, nous nous focaliserons sur les connaissances accumulées depuis 1994 sur la maladie chez les cétacés et les pinnipèdes. Enfin, une dernière partie sera dédiée à l'impact de la bactérie sur les autres espèces animales et le potentiel zoonotique de celle-ci.

2.1. Caractérisation moléculaire des *Brucella* marines

La classification des *Brucella* marines est largement basée sur des données provenant de l'Atlantique Nord (Cloeckert *et al.*, 2011). En 1994, les souches issues des premiers prélèvements sur mammifères marins ont été identifiées comme appartenant au genre *Brucella* par la morphologie des colonies et des cellules, l'activité biochimique, l'agglutination sur sérum monospécifique et les profils métaboliques. Toutes les caractéristiques trouvées n'ont pas été assimilables à l'une ou l'autre des six espèces de *Brucella* bien connues à cette époque. C'est pourquoi, faute d'études plus approfondies, il a été suggéré de les nommer *Brucella maris* (Jahans *et al.*, 1997). Des études ultérieures ont démontré que *Brucella maris* était homogène par ADN-ADN hybridation aux souches de *Brucella* terrestres (77%) et a été confirmée comme appartenant au genre *Brucella* par homologie de l'ARN ribosomique 16S (Foster *et al.*, 2007 ; Banai et Corbel, 2010).

2.1.1. *Etude des gènes codant pour les protéines de la membrane externe (gènes omp)*

Les gènes *omp* sont les gènes codant pour des protéines de la membrane externe des *Brucella* (Cloeckert *et al.*, 2001). Les protéines de la membrane externe peuvent être, entre autres, des lipoprotéines qui donnent une stabilité à la membrane ou des porines qui forment des canaux permettant les échanges avec le milieu environnemental, mais qui peuvent aussi servir de récepteurs pour des phages et enfin d'autres protéines structurales (Markey *et al.*, 2013). Leur étude est particulièrement intéressante puisque ces gènes se sont révélés très polymorphiques et permettent donc de différencier les espèces entre elles ainsi que leurs biovars (Cloeckert *et al.*, 2001).

a) Le gène *omp28* :

Le gène *omp28* (ou *bp26*) code pour la protéine périplasmique BP26 qui est un antigène majeur pour la colonisation de l'organisme par les espèces de *Brucella* circulant dans les troupeaux de ruminants domestiques, mais dont le rôle précis n'a pas été élucidé (Kim et al., 2013). Chez les espèces de *Brucella* terrestres, le gène *omp28* présente une phase ouverte de lecture (ORF) de 1 029 paires de base (pb). De manière intéressante, l'amplification du gène *omp28* par PCR chez les espèces de *Brucella* marines montre que l'ORF compte 1 900 pb (Cloeckeaert et al., 2000). Son séquençage a révélé la présence d'une séquence d'insertion, nommée *IS711*, située entre *omp28* et la séquence palindromique Bru-RS1 (fig.1).

L'*IS711* est depuis longtemps considéré comme un bon marqueur du genre *Brucella* permettant également de discriminer les espèces de *Brucella* et leurs biovars en fonction de son nombre de copies et de sa répartition dans le génôme (voir ci-après, paragraphe 2.1.2). Dans cette optique, une amplification de cette séquence d'insertion par PCR standardisée est répertoriée sur la base de données GenBank (Cloeckeaert et al., 2000).

Aujourd'hui, la présence de la séquence d'insertion *IS711* en aval du gène *bp26* est reconnue comme un marqueur spécifique permettant de différencier les *Brucella* terrestres des *Brucella* marines (Cloeckeaert et al., 2000). En effet, on retrouve un plus grand nombre de copies de la séquence *IS711* chez les *Brucella* marines que chez les espèces de *Brucella* terrestres, à l'exception de *Brucella ovis* qui possède plus de 35 copies (Foster et al., 2007).

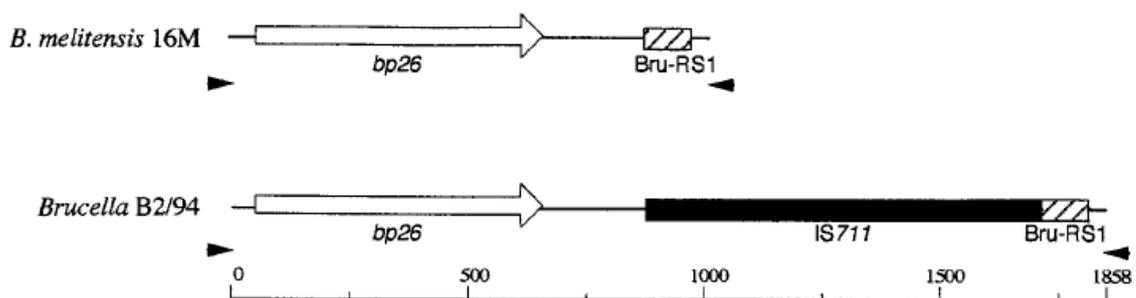


Figure 1: Organisation génomique du locus *omp28* (*bp26*) de *Brucella melitensis* 16M et d'un isolat de phoque B2/94.

(d'après Cloeckeaert et al., 2000)

b) Les gènes *omp2* :

Les gènes *omp2a* et *omp2b* codent pour deux porines homologues de 36kDa. Ces gènes sont étroitement liés dans le génome de *Brucella* et sont orientés dans des directions opposées (Banai et Corbel, 2010).

Les *Brucella* terrestres présentent une copie de chaque gène : *omp2a* et *omp2b*, avec une exception pour *Brucella ovis* qui présente deux copies du gène *omp2a* et pas de gène *omp2b* (Banai et Corbel, 2010). Les *Brucella* issues de cétacés ont la particularité de ne pas présenter de gène *omp2a* mais possèdent au contraire deux copies du gène *omp2b* (Cloeckeaert *et al.*, 2001). Enfin, les souches issues de pinnipèdes présentent une copie du gène *omp2a* et une copie du gène *omp2b* (Cloeckeaert *et al.*, 2001).

Les gènes *omp2* de *Brucella* isolées chez les mammifères marins présentent des motifs spécifiques (Cloeckeaert *et al.*, 2001 ; Foster *et al.*, 2007). De plus, l'élaboration de cartes de restriction des gènes *omp2a* et *omp2b* permet de discriminer les espèces de *Brucella* issues de mammifères marins (Dawson *et al.*, 2008b). Pour ce faire, pour chacun des gènes *omp2*, les auteurs attribuent une lettre à chaque profil de restriction différent. La nomenclature X(Y) représente la combinaison des profils de restriction des gènes *omp2b* et, entre parenthèses, *omp2a*. Cette étude a permis de grouper les isolats de mammifères marins de la façon suivante :

- Le profil M(J) composé de 79% d'isolats de marsouins, 15% de dauphins, 4% de phoques et 2% de baleines ;
- Le profil N(K) présentant à 100% d'isolats provenant de dauphins ;
- Le profil L(I) composé à 95% des isolats de phoques ;
- Le profil O(I) comportant 85% d'isolats de phoques ;
- Les profils P(I) et Q(I) regroupant les isolats issus de phoques à capuchon et un isolat d'avorton de grand dauphin en Californie.

Ce résultat suggère une dichotomie parmi les souches de *Brucella* issues de mammifères marins avec, d'un côté, les *Brucella* isolées de pinnipèdes et, de l'autre, des *Brucella* isolées de cétacés. Ce constat est en accord avec les caractéristiques phénotypiques évoquées précédemment (*c.f.* paragraphe 1.2.3. Croissance): les souches issues des pinnipèdes nécessitent du dioxyde de carbone pour leur croissance et sont incapables de métaboliser le D-galactose contrairement aux souches issues de cétacés (Jahans *et al.*, 1997).

Cette relation entre le polymorphisme des gènes *omp2* et le spectre d'hôte des bactéries a démontré l'existence d'au moins deux espèces de *Brucella* marines au lieu de la seule *B. maris*. Elles furent initialement dénommées *Brucella cetaceae* et *Brucella pinnipediae* (Cloeckaert *et al.*, 2001). L'existence de ces deux espèces fut confirmée par PCR-Infrequent Restriction Site, qui prend en compte le nombre plus important de séquence d'insertion *IS711* dans le génome des *Brucella* marines (Foster *et al.*, 2007). Aujourd'hui, ces deux espèces sont répertoriées sous les noms de *Brucella ceti* pour les cétacés et *Brucella pinnipedialis* pour les pinnipèdes (Banai et Corbel, 2010).

c) La famille de gènes *omp25/omp31* :

La famille *omp25/omp31* est composée de cinq gènes bien connus dans le genre *Brucella* : *omp31b*, *omp25b*, *omp25c*, *omp25d* et *omp22*. Ces gènes codent pour des protéines, dont certaines sont des porines, de la membrane externe qui ont un rôle dans la virulence de la bactérie (Vizcaino *et al.*, 2004). Ils sont bien conservés dans ce genre bactérien bien que quelques différences entre espèces aient été soulignées (Vizcaino *et al.*, 2004). Concernant notre étude, aucune donnée disponible à ce jour ne révèle de différence significative entre les espèces de *Brucella* marines et celles des *Brucella* terrestres. En revanche, une inversion d'un fragment d'ADN de 1747 pb par rapport à l'orientation de référence, incluant le gène *omp25b* et presque entièrement deux gènes adjacents, a été révélée pour la plupart des souches de *Brucella ceti*. Le fait que la totalité des échantillons de *Brucella ceti* ne montre pas cette inversion suggérerait la présence de plusieurs biovars (Vizcaino *et al.*, 2004).

2.1.2. **Empreintes génétiques de la séquence d'insertion *IS711***

Comme abordé précédemment, l'empreinte génétique de la séquence d'insertion *IS711* chez les *Brucella* issues de mammifères marins a permis d'affiner leur classification.

La distribution des copies de l'*IS711* dans le génome des 102 souches de *Brucella* marines incluses dans cette étude ont montré peu de ressemblances avec les profils observés chez les mammifères terrestres, même ceux de *Brucella ovis* et *Brucella suis* biovar 2 qui possèdent beaucoup de copies de cet élément (Guzman-Verri *et al.*, 2012). A partir de 17 empreintes génétiques, il a été possible de grouper les *Brucella* de mammifères marins en quatre groupes en respectant au minimum 85% de similarité pour les souches d'un même groupe (fig.2). Les membres du groupe 1 ont été associés principalement à des isolats de phoques possédant les patterns L(I) et O(I) pour les gènes *omp2a* et *omp2b* (c.f paragraphe

2.1.1.b). Le groupe 2 rassemble en grande majorité des isolats provenant de marsouins possédant le pattern M(J). Les isolats du groupe 3 sont exclusivement issus de dauphins et correspond au pattern N(K). Enfin, le groupe 4, correspondant au pattern P(I), est seulement composé d'isolats de phoques à capuchons (Dawson *et al.*, 2008b ; Guzman-Verri *et al.*, 2012).

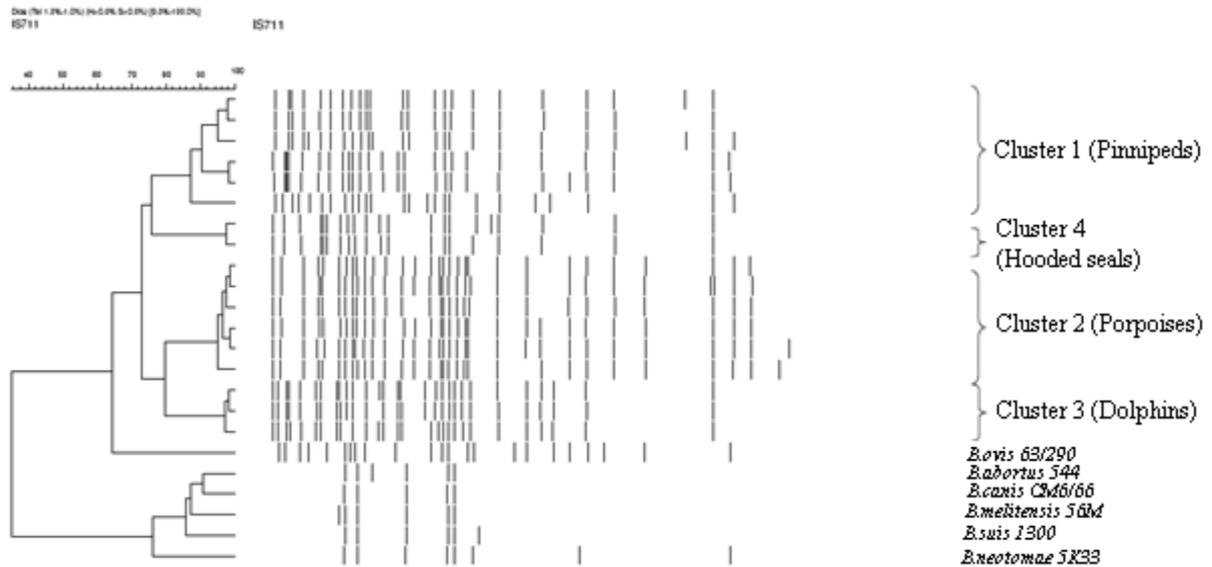


Figure 2: Empreintes génétiques de l'IS711 de souches issues de mammifères marins et de souches de référence.

Pinnipeds : pinnipèdes ; Hooded seals : phoques à capuchon ; Porpoises : marsouins ; Dolphins : dauphins (d'après Dawson *et al.*, 2008b)

2.1.3. Autres méthodes

a) Approche par PCR-Infrequent Restriction Site Derivative (IRS-PCR) :

Cloeckaert *et al.*, 2003 a publié une étude sur la caractérisation des souches de *Brucella* marines par IRS-PCR, en tenant compte du nombre plus élevé de *IS711* chez ces *Brucella*. Les séquences de nucléotides des fragments d'ADN détectés par IRS-PCR ont été utilisées pour développer des tests d'identification de PCR pour discriminer *Brucella ceti* et *Brucella pinnipedialis*. Cette méthode moléculaire examine donc la présence ou l'absence de quatre fragments distincts. La présence des fragments II et III est corrélée à l'appartenance des souches au groupe 2 par la distribution de la séquence *IS711* donc principalement aux marsouins (Dawson *et al.*, 2008b). Cette même étude a déterminé que le fragment IV est présent seulement chez des isolats de dauphins correspondant au groupe 3 défini dans la sous-partie précédente. Enfin, le fragment I semble être spécifique des souches principalement isolées de phoques (groupes 1 et 4 par empreinte de *IS711*). Quatre isolats n'ont montré aucun

produit par amplification. Il s'agit de trois isolats du groupe 1 provenant des Etats-Unis et d'une souche isolée d'un phoque à capuchon de Grande-Bretagne (Dawson *et al.*, 2008b ; Guzman-Verri *et al.*, 2012).

b) Analyse de Séquences Multilocus (MLSA) :

Le séquençage multilocus examine la longueur de séquences d'ADN de neuf fragments indépendants de gènes de ménage de *Brucella* (Godfroid *et al.*, 2010). En comparant les souches de *Brucella* terrestres avec celles issues de mammifères marins, ces dernières se sont révélées comme appartenant à un groupe génétique distinct composé de cinq séquences types numérotées de ST23 à ST27 (fig.3). Cette analyse va dans le sens de l'appartenance des souches de *Brucella* marines à une ou plusieurs nouvelles espèces de *Brucella*.

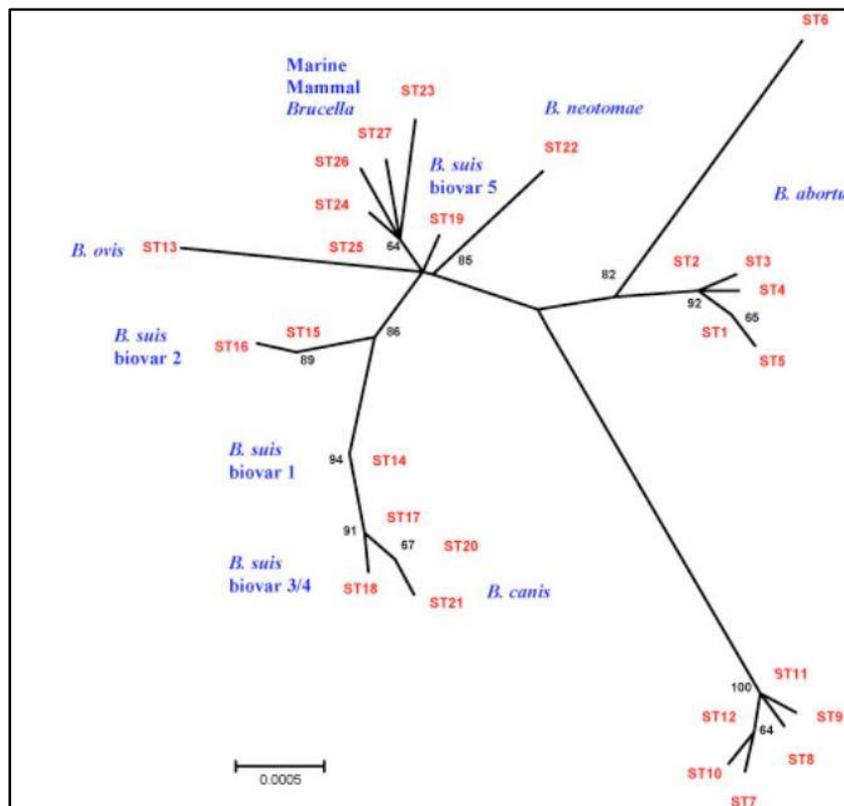


Figure 3: Reconstruction phylogénétique des relations entre les séquences types (STs) des *Brucella*. (d'après Banai et Corbel, 2010)

La séquence type ST23 est retrouvée dans 74% des cas chez des marsouins. Les séquences types ST24 et ST25, qui divergent au niveau d'un seul nucléotide, chez des phoques à 84%. La séquence type ST26 est retrouvée chez tous les isolats de dauphins. Enfin, la séquence type ST27 a été analysée chez un avorton de grand dauphin aux Etats-Unis et

chez un cas zoonotique en Nouvelle-Zélande. Cette séquence présente plus de similarité avec les STs de phoques que ceux de dauphins et de marsouins (2-3 divergences contre 4-5) (Groussaud *et al.*, 2007 ; Guzman-Verri *et al.*, 2012, Godfroid *et al.*, 2010).

Comme le montre la figure 3, ces résultats suggèrent l'existence, de non pas deux, mais trois espèces de *Brucella* marines.

c) Typage par Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) :

Cette étude est basée sur le séquençage de 21 marqueurs présentant des séquences répétées de 5 pb ou plus. Cela a permis de séparer les *Brucella* marines en trois groupes distincts. Le groupe A est exclusivement composé d'isolats de dauphins et correspond à la ST26. 73% d'isolats de marsouins composent le groupe B, assimilable au groupe de la ST23. Enfin, le groupe C, composé en grande majorité (80%) d'isolats de phoques, est subdivisible en trois sous-groupes. Le sous-groupe C1 correspondant à la ST24, le C2 à ST25 et le C3 étant composé de seulement deux isolats, un de phoque à capuchon et l'autre d'un avorton de grand dauphin c'est-à-dire ST27. De manière étrange, le groupe B semble présenter plus de similarité avec le groupe C qu'avec le groupe A (Groussaud *et al.*, 2007).

Ce résultat de groupage, combiné à celui obtenu par MLSA, a amené les auteurs à proposer trois espèces de *Brucella* marines plutôt que deux :

- *Brucella delphini* pour les dauphins ;
- *Brucella phocoenae* pour les marsouins ;
- *Brucella phocae* pour les phoques.

Cette classification en trois espèces est dorénavant communément partagée par la communauté scientifique (Corbel et Banai, 2005 ; Groussaud *et al.*, 2007, Dawson *et al.*, 2008b). Cependant, d'autres études sont nécessaires, notamment dans l'hémisphère Sud, avant de modifier la nomenclature des *Brucella* marines. C'est pourquoi, les noms *Brucella ceti* et *Brucella pinnipedialis* sont encore d'usage.

d) Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeat Analysis (MLVA) :

Cette technique vise à déterminer le nombre de courtes séquences répétées réparties dans le génome de la plupart des bactéries: le nombre de répétitions étant extrêmement

variable d'une souche à l'autre, l'identité ou la proximité de 2 souches peut ainsi être établie de manière très fiable. Plusieurs MLVA ont été développées pour différencier les espèces de *Brucella*. A titre d'exemple, il a été mis en place une MLVA visant 15 marqueurs dont 8 moyennement variables (minisatellites) et 7 fortement discriminants (microsatellites) (Lafèche *et al.*, 2006). Mais la méthode MLVA la plus utile à la classification se base sur 16 marqueurs d'où son nom MLVA-16. L'étude, réalisée sur 295 souches, a permis une classification des *Brucella* de mammifères marins en 3 groupes (fig.4) (Maquart *et al.*, 2009):

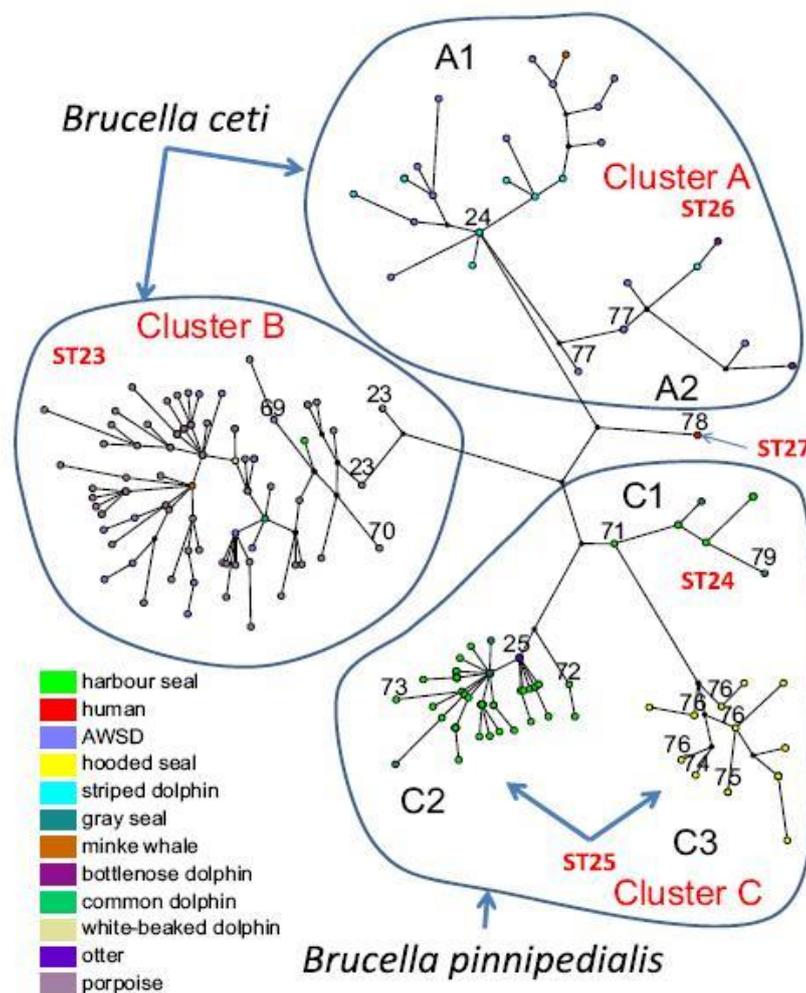


Figure 4: Arbre phylogénique des *Brucella marines* obtenu par MLVA-16.

Harbour seal = phoque veau-marin ; human = humain ; AWSD = Atlantic white sided dolphin = dauphin à flancs blancs ; hooded seal = phoque à capuchon ; striped dolphin = dauphin bleu et blanc ; gray seal = phoque gris ; minke whale = petit rorqual ; bottlenose dolphin = tursiops = grand dauphin ; common dolphin = dauphin commun ; white-beaked dolphin = dauphin à bec blanc ; otter = loutre ; porpoise = marsouin.

(d'après Macquart *et al.*, 2009)

L'analyse des souches regroupées dans les différents clusters présentés figure 4 conduit à l'établissement de trois groupes distincts :

- **Le groupe A** correspond à *Brucella ceti*. Il comprend les sous-groupes A1 et A2 regroupant des isolats de dauphins et celui d'un petit rorqual, assimilables à ST26 (Macquart et *al.*, 2009). Le sous groupe P1, quant a lui, contient les isolats de dauphins du Pacifique Est (Guzman-Verri et *al.*, 2012). Ce dernier sous-groupe n'est pas représenté sur la figure 4, qui ne regroupe que des isolats de l'Atlantique.
- **Le groupe B** présente 64% de souches de marsouins, quelques isolats de dauphins, un isolat issu d'un petit rorqual et un isolat de phoque.
- **le groupe C** correspond à *Brucella pinnipedialis*. Le sous-groupe C1 correspond à des isolats de phoques principalement veaux-marins et un isolat de petit rorqual (ST24) alors que le sous-groupe C2 présente des isolats de phoques gris et veaux-marins et celui d'une loutre de mer (ST25). Le sous-groupe C3 enfin, contient des souches de phoques à capuchon.

La souche zoonotique retrouvée en Nouvelle-Zélande et identique à celle retrouvée dans un avorton de grand dauphin aux Etats-Unis, et est clairement séparée des groupes constitués ci-dessus. Elle se trouve en position intermédiaire comme l'évoquait déjà l'étude MLSA. Il faudrait analyser et typer un nombre plus important de souches provenant du Pacifique pour affiner cette classification.

2.1.4. *Classification actuelle des Brucella marines*

La figure 5 présente un bilan des diverses études moléculaires réalisées pour permettre de classer les différentes souches de *Brucella ceti* et de *Brucella pinnipedialis*.

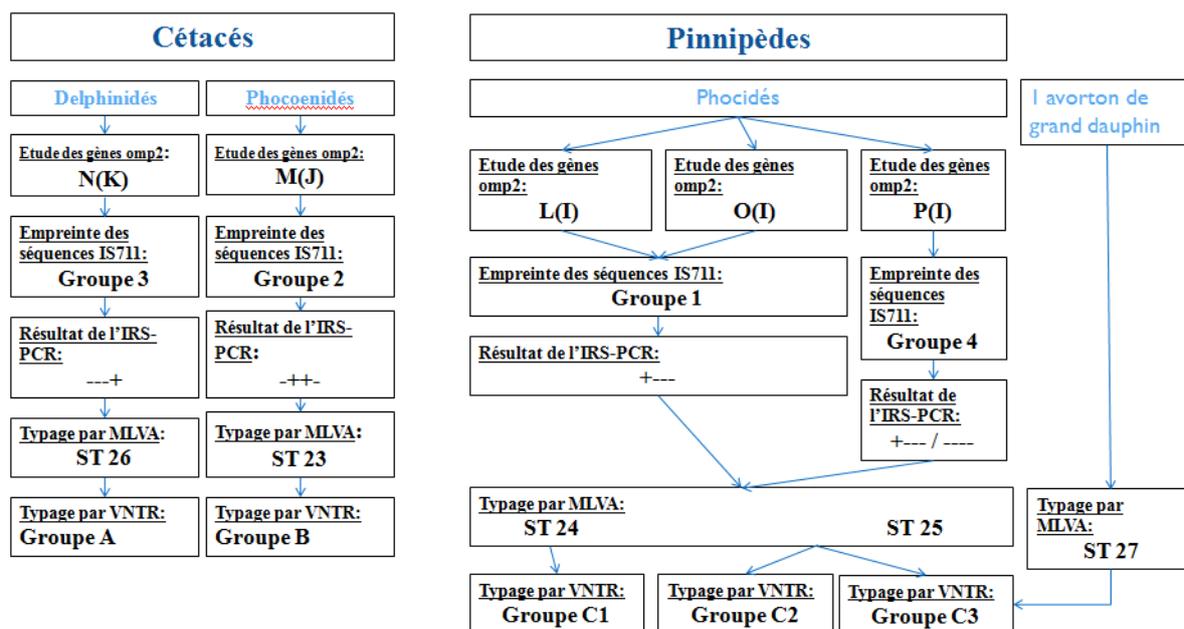


Figure 5: Schéma bilan des études moléculaires des espèces marines de *Brucella*.

(d'après Cloeckart *et al.*, 2000 ; Cloeckart *et al.*, 2001 ; Groussaud *et al.*, 2007 ; Dawson *et al.*, 2008b ; Macquart *et al.*, 2009)

Les résultats du MLSA ont caractérisé les isolats de mammifères marins comme un groupe distinct au sein des *Brucella* marines. En outre, en accord avec l'ensemble des données citées précédemment, leurs séquences types divergent significativement en fonction de leur hôte d'origine, justifiant l'établissement de trois plutôt que de deux espèces.

- *Brucella delphini* pour les dauphins ;
- *Brucella phocoenae* pour les marsouins ;
- *Brucella phocae* pour les phoques.

Malgré le fait qu'à l'heure actuelle, seules deux espèces de *Brucella* marines soient reconnues, nommées *Brucella ceti* et *Brucella pinnipedialis*, de nouvelles propositions de classification sont publiées au fur et à mesure des découvertes. La plupart des études moléculaires réalisées afin de permettre une caractérisation et une classification des souches de *Brucella* marines ont été réalisées à partir d'échantillons prélevés sur des animaux de l'Atlantique, principalement dans l'hémisphère Nord. Afin de valider, ou non, la classification proposée actuellement, il serait donc intéressant d'étudier des souches de *Brucella* marines issues d'autres mers ou océans.

A ce titre, une étude s'intéressant aux petits rorquals de l'océan Pacifique a apporté des données d'intérêt (Ohishi *et al.*, 2008). Les auteurs ont isolées souches de *Brucella* de

dix petits rorquals afin de les caractériser par les méthodes moléculaires déjà vues précédemment. Le gène codant pour la protéine BP26 est similaire à celui des *Brucella* issues de l'océan Atlantique, présentant la séquence d'insertion *IS711* caractéristique en aval de ce gène. La caractérisation des gènes *omp2* chez les *Brucella* de ces petits rorquals a révélé la présence d'une copie du gène *omp2a* et d'une copie du gène *omp2b*. Cette distribution correspond à celle des *Brucella* de phoques de l'Atlantique car celle des cétacés de l'Atlantique, rappelons-le, possède deux copies du gène *omp2b*. L'étude des quatre fragments d'ADN distincts par IRS-PCR a permis de mettre en évidence la présence du fragment I et l'absence des trois autres. Là encore, cette donnée se rapproche des caractéristiques des isolats de *Brucella pinnipedialis* de l'Atlantique plutôt que *Brucella ceti* (Ohishi *et al.*, 2008). Ces souches de *Brucella* issues de petits rorquals, donc de cétacés, présentent plus de similarité avec *Brucella pinnipedialis* de l'Atlantique Nord. Ceci tend à démontrer que la classification des *Brucella* selon la préférence d'hôte, comme elle a été proposée en Atlantique, pourrait ne pas être appropriée ailleurs autour du globe. Cependant, de plus amples études sur des échantillons du Pacifique et de l'hémisphère Sud sont nécessaires, d'autant plus que l'étude précédemment citée ne comprend que dix isolats du Pacifique et qu'une autre étude dans cet océan a permis d'isoler *Brucella ceti*, présentant les mêmes caractéristiques que celle de l'Atlantique Nord, chez des dauphins bleu et blanc (Hernandez-Mora *et al.*, 2008).

2.2. Les infections à *Brucella* chez les mammifères marins

2.2.1. *Epidémiologie*

a) Réservoir :

Les *Brucella* terrestres ne se multiplient pas en dehors de leur hôte mais sont très résistantes dans l'environnement. Elles peuvent ainsi persister plusieurs années dans des placentas ou avortons congelés, pendant des mois en condition humide à 10-15°C et des heures à des températures de 45-50°C. Concernant les *Brucella* marines, aucune étude n'a été réalisée pour déterminer leur résistance dans le milieu océanique. L'océan est un environnement présentant des conditions souvent extrêmes (*e.g* température, pH, osmolarité). De plus, l'effet de dilution compromet fortement la rencontre entre les *Brucella*, non mobiles, et leur hôte. Certains auteurs en concluent que l'océan lui-même ne serait pas une source possible de la bactérie (Nymo *et al.*, 2011 ; Guzman-Verri *et al.*, 2012 ; Hernandez-Mora *et al.*, 2013). Ainsi, le réservoir des *Brucella* marines serait représenté par toutes les espèces

infectées qui peuvent excréter la bactérie. Les pinnipèdes infectés peuvent plus facilement la transmettre à leurs congénères. De plus, il se pourrait que les poissons soient porteurs de *Brucella* et puissent la transmettre aux mammifères marins (c.f. paragraphe 2.2.1. d)). Cette perspective est pour le moins inquiétante en terme de potentiel zoonotique, ce qui sera discutée plus loin dans ce manuscrit.

b) Spectre d'hôte :

La présence de *Brucella spp.* a été mise en évidence chez de nombreuses espèces de pinnipèdes et de cétacés par culture directe ou par PCR. La liste des espèces concernées par l'infection est présentée dans le tableau 6. Elle est non exhaustive et s'allonge au fur et à mesure des études de terrain.

Tableau 6: Liste des espèces de mammifères marins chez lesquelles *Brucella* a été isolée ou détectée.

| | Nom français | Nom anglais | Nom binominal |
|--|--|------------------------------|-----------------------------------|
| P I N N I P E D E S | Phoque veau-marin ou phoque commun | Harbor seal | <i>Phoca vitulina</i> |
| | Phoque annelé ou marbré | Ringed seal | <i>Phoca hispida</i> |
| | Phoque du Groënland | Harp seal | <i>Phoca groenlandica</i> |
| | Phoque à capuchon | Hooded seal | <i>Cystophora cristata</i> |
| | Phoque gris | Gray seal | <i>Halichoerus grypus</i> |
| | Lion de mer de Californie | Californian sea lion | <i>Zalophus californiacus</i> |
| C E T A C E S | Dauphin commun à bec court | Common dolphin | <i>Delphinus delphi</i> |
| | Marsouin commun | Harbor porpoise | <i>Phocoena phocoena</i> |
| | Dauphin bleu et blanc | Striped dolphin | <i>Stenella coeruleoalba</i> |
| | Grand dauphin ou tursiops | Bottlenose dolphin | <i>Tursiops truncatus</i> |
| | Dauphin à flancs blancs | Atlantic white sided dolphin | <i>Lagenorhynchus acutus</i> |
| | Dauphin à nez blanc | White beaked dolphin | <i>Lagenorhynchus albirostris</i> |
| | Dauphin d'Hector | White headed dolphin | <i>Cephalorhynchus hectori</i> |
| | Orque ou épaulard | Killer whale | <i>Orcinus orca</i> |
| | Petit rorqual ou rorqual à museau pointu | Minke whale | <i>Blaenoptera acuterostrata</i> |
| | Narval | Narwhal | <i>Monodon monoceros</i> |
| Baleine franche australe | Southern right whale | <i>Eubalaena australis</i> | |

Parallèlement, certains animaux possèdent des anticorps anti-*Brucella* sans pour autant que la bactérie puisse être isolée (tableau 7). Ce phénomène est courant lors de la recherche de *Brucella*, en effet, lors de la phase locorégionale, les bactéries se situent dans les nœuds

lymphatiques et seule la détection des anticorps est possible, d'où l'importance des méthodes sérologiques.

Tableau 7: Espèces de mammifères marins chez lesquelles seuls des anticorps anti-*Brucella* ont été détectés.

| | Nom français | Nom anglais | Nom binominal |
|---|--------------------------------|-------------------------------|---|
| P I N N I P E D E S C E T A C E S | Phoque de Weddell | Weddell seal | <i>Leptorychotes weddelli</i> |
| | Otarie à fourrure d'Atlantique | Atlantic fur seal | <i>Arctocephalus gazella</i> |
| | Phoque moine d'Hawaï | Hawaien monk seal | <i>Monachus schawinslandi</i> |
| | Lion de mer australien | Australian sea lion | <i>Neophoca cinerea</i> |
| | Morse d'Atlantique | Atlantic walrus | <i>Odobenus rosmarus</i> <i>rosmarus</i> |
| | Marsouin de Burmeister | Burmeister's porpoise | <i>Phocoena spinipinus</i> |
| | Dauphin commun à bec long | Long beaked common dolphin | <i>Delphinus capensis</i> |
| | Dauphin obscur | Dusky dolphin | <i>Lagenorhynchus obscurus</i> |
| | Rorqual commun | Fin whale | <i>Balaenoptera borealis</i> |
| | Beluga | Beluga | <i>Delphinapterus leucas</i> |
| Baleine pilote | Pilot whale | <i>Globicephala melas</i> | |
| Cachalot pygmée | Pygmy sperm whale | <i>Kogia breviceps</i> | |
| Grand cachalot | Sperm whale | <i>Physeter macrocephalus</i> | |

En conclusion, des *Brucella* ont été directement mises en évidence chez six espèces de pinnipèdes et onze espèces de cétacés (Center for Food Security and Public Health, 2009 ; Guzman-Verri *et al.*, 2012 ; Hernandez-Mora *et al.*, 2013). Des anticorps anti-*Brucella* ont été détectés chez quatorze espèces de pinnipèdes et trente-cinq espèces de cétacés (mysticètes et odontocètes) (Center for Food Security and Public Health, 2009 ; Guzman-Verri *et al.*, 2012 ; Hernandez-Mora *et al.*, 2013). A l'heure actuelle, aucune bactérie du genre *Brucella*, ni aucun anticorps, n'a été retrouvé chez les siréniens (dugons et lamantins) ou chez les dauphins de rivière.

D'autres espèces de mammifères apparentés aux mammifères marins ont présenté des résultats sérologiques positifs pour la brucellose (Hernandez-Mora *et al.*, 2013). Des ours polaires se sont révélés positifs par diverses techniques sérologiques dont des méthodes

ELISA et d'agglutination. Ces ours séropositifs ne présentent apparemment pas de signes cliniques bien que l'impact réel de cette exposition reste inconnu. Or, la séropositivité des ours polaires coïncide avec la présence de nombreux phoques annelés séropositifs dans la région, qui s'avèrent être les proies favorites de ces ursidés (Tryland *et al.*, 2001). Des loutres de mer sont aussi séropositives à *Brucella* notamment en Alaska. L'établissement récent d'un test sérologique spécifique à *Brucella pinnipedialis* a permis de révéler des sérologies positives chez des loutres de mer de l'île de Béring en Russie et de Kodiak aux Etats-Unis. La transmission à cette espèce n'est pas expliquée. On peut émettre l'hypothèse d'une transmission par le contact avec les phoques, lors de traumatisme ou via des parasites de type nématodes (Hanni *et al.*, 2003 ; Goldstein *et al.*, 2011).

Il convient d'insister sur le fait que beaucoup d'animaux sont séropositifs mais peu présentent des signes cliniques. De plus, le dépistage direct de *Brucella* est rarement concluant, même parmi les animaux présentant des sérologies positives (Van Bresse *et al.*, 2001).

c) Sensibilité à l'infection : Facteurs favorisants :

Un seul facteur potentiellement favorisant a pour l'instant été étudié. Il existe de plus en plus de preuves de l'effet immunodépresseur des xénobiotiques chez les mammifères marins. Une étude a montré que l'infection par *Brucella ceti* est associée à la présence d'un haut taux de chlorobiphényle dans la graisse de dauphins (Davison *et al.*, 2011). L'effet néfaste des xénobiotiques pourrait augmenter la sensibilité des cétacés exposés à l'infection par *Brucella ceti*. Cela a également été suggéré chez les pinnipèdes (Davison *et al.*, 2011 ; Guzman-Verri *et al.*, 2012 ; Lambourn *et al.*, 2013). Cependant ces études ne portent que sur deux ou trois animaux, ce qui n'est pas représentatif de la population totale. De plus, cela concerne des animaux échoués dont la plupart sont amaigris. Or les xénobiotiques sont lipophiles, donc chez les animaux amaigris, il y a de toute façon une plus grande concentration de xénobiotiques dans les graisses ce qui biaise la conclusion que l'on peut apporter.

La séroprévalence augmente de manière significative après le sevrage (Lynch *et al.*, 2011). Les otariidés ont des taux de prévalence moins élevés que les phocidés (Jensen *et al.*, 2013).

- Les pinnipèdes

Les pinnipèdes semblent peu sensibles à la brucellose car peu de signes cliniques sont décrits mais ils sont très réceptifs à *Brucella pinnipedialis*, en témoigne les hauts taux de séroprévalence chez ces animaux (Center for Food Security and Public Health, 2009 ; Godfroid *et al.*, 2010; Guzman-Verri *et al.*, 2012).

- Les cétacés

Les cétacés sont plus sensibles que les pinnipèdes, de nombreux signes cliniques ayant été décrits. Les espèces les plus sensibles sont le marsouin commun, le dauphin bleu et blanc, le grand dauphin et le dauphin commun chez les odontocètes. Les petits rorquals semblent être l'espèce de mysticètes la plus sensible. Parmi toutes ces espèces, le dauphin bleu et blanc est réellement l'espèce présentant des signes cliniques graves et de sévères lésions décrites dans les publications, de type méningoencéphalite (Miller *et al.*, 1999 ; Hernandez-Mora *et al.*, 2008 ; Jauniaux *et al.*, 2010 ; Davison *et al.*, 2013).

d) Transmission :

En ce qui concerne les *Brucella* terrestres, la transmission survient habituellement par contact avec les avortons ou le placenta, *via* le matériel infecté, par des plaies, par la lactation, par les insectes piqueurs mais aussi parfois par voies respiratoire et digestive. Il ne faut pas oublier la transmission verticale de la mère au fœtus qui cause le principal symptôme de la maladie à savoir l'avortement (Nymo *et al.*, 2011).

Les modes de transmission des *Brucella* marines n'ont pas été clairement établis. Néanmoins, par analogie avec ce que l'on connaît de la transmission chez les *Brucella* terrestres et grâce aux données des différentes études menées sur la brucellose chez les mammifères marins, nous pouvons émettre quelques hypothèses en ce qui concerne les voies de transmission de la bactérie dans le milieu marin.

- Transmission horizontale

Concernant la transmission horizontale, l'exposition à la bactérie par contact pourrait surtout intervenir chez les phoques qui sont des animaux grégaires contrairement aux cétacés qui sont dans la majorité des cas, des animaux solitaires. De plus, la bactérie a été mise en évidence dans la salive et l'urine de ces animaux (Lambourn *et al.*, 2013). Ceci pourrait

suggérer une transmission par morsure, les phoques ayant l'habitude de se disputer les meilleures places pour la sieste sur les sites de repos.

La bactérie étant fréquemment isolée des poumons des animaux infectés, une transmission par aérosol pourrait être envisageable (Jauniaux *et al.*, 2010 ; Guzman-Verri *et al.*, 2012 ; Lambourn *et al.*, 2013).

La transmission de la bactérie lors de rapport sexuel semble également possible, la bactérie ayant été isolée des organes reproducteurs de cétacés (Miller *et al.*, 1999, Center for Food Security and Public Health, 2009 ; Godfroid *et al.*, 2010; Guzman-Verri *et al.*, 2012). Dans ce sens, il a été démontré que la séroconversion ne s'effectue généralement qu'à la puberté (Meegan *et al.*, 2012).

Bien entendu, comme chez les mammifères terrestres, les placentas et les avortons des animaux infectés présentent une charge bactérienne très élevée et peuvent ainsi représenter une source de transmission. Cette voie de transmission pourrait avoir un rôle plus important chez les phoques qui ont une vie terrestre. Ces derniers sont en effet plus susceptibles d'être exposés aux déchets raménés sur terre par les oiseaux marins (Ewalt *et al.*, 1994 ; Center for Food Security and Public Health, 2009 ; Godfroid *et al.*, 2010 ; Guzman-Verri *et al.*, 2012).

Une transmission par le lait maternel apparaît tout à fait possible puisque la bactérie a été isolée de ce liquide chez les cétacés (Center for Food Security and Public Health, 2009 ; Jauniaux *et al.*, 2010 ; Godfroid *et al.*, 2010; Guzman-Verri *et al.*, 2012). En revanche, ce dernier mode de transmission horizontale n'a trouvé aucune preuve chez les pinnipèdes (Lambourn *et al.*, 2013).

Pour finir, chez les pinnipèdes, la bactérie semble être également excrétée par les fèces qui peuvent alors contaminer les autres individus de la colonie (Lambourn *et al.*, 2013).

- Transmission verticale

La transmission verticale de la mère au fœtus est prouvée chez les cétacés (Ewalt *et al.*, 1994 ; Hernandez-Mora *et al.*, 2008 ; Maquart *et al.*, 2009 ; Godfroid *et al.*, 2010 ; Gonzales-Barrientos *et al.*, 2010 ; Guzman-Verri *et al.*, 2012) mais est encore à l'étude chez les pinnipèdes où deux seul cas possibles d'avortement à cause de la brucellose ont été décrits chez des lions de mer de Californie (Goldstein *et al.*, 2009). La culture des placentas est revenue positive à *Brucella spp.* ainsi que la RT-PCR du gène *bcsp31*. Cependant, le placenta

ne présentait aucune lésion. En attendant plus de preuves, les scientifiques pensent que ce mode de transmission n'existe pas chez les pinnipèdes (Godfroid *et al.*, 2014).

- Des vecteurs possibles de la bactérie ?

Les parasites pourraient jouer un rôle important dans la transmission de la brucellose chez les mammifères marins. Dès 1997, Garner *et al.*, ont pu identifier la présence de *Brucella spp.* dans l'utérus et l'appareil digestif d'un nématode pulmonaire femelle, *Parafilaroides*, infestant un phoque veau-marin. L'immunomarquage et la microscopie électronique ont permis de révéler la présence de *Brucella* en étroite liaison avec les cellules épithéliales de l'utérus de femelles nématodes. La présence de bactéries immunomarquées dans des granulomes inflammatoires pulmonaires contenant des larves de nématode et la présence d'antigènes de *Brucella* dans les macrophages du parenchyme pulmonaire à proximité des parasites infectés suggèrent que la transmission de *Brucella pinnipedialis* par des vers pulmonaires chez le phoque veau-marin est une possibilité (Perrett *et al.*, 2004a). Cette hypothèse est également suggérée par d'autres publications plus récentes chez les cétacés où la bactérie a été identifiée dans des vers pulmonaires de l'espèce *Pseudalius inflexus* chez un marsouin commun (Jauniaux *et al.*, 2010) ou d'*Halocercus* chez des grands dauphins (Davison *et al.*, 2011). Certaines études suggèrent même que dans 50% des cas, il y a association de *Brucella* et d'une infestation parasitaire pulmonaire (Lambourn *et al.*, 2013). Le fait est que *Brucella* est souvent isolée des poumons chez les mammifères marins (Prenger-Berninghoff *et al.*, 2008 ; Center for Food Security and Public Health, 2009 ; Godfroid *et al.*, 2010 ; Guzman-Verri *et al.*, 2012). On peut alors se demander si les parasites contaminent leur hôte ou bien l'hôte infecté contamine les parasites. Rappelons que les *Brucella* n'ont aucun tropisme particulier pour les poumons et que chez les mammifères terrestres, on ne retrouve pas la bactérie dans cet organe (Banai et Corbel, 2010). Le fait de trouver la bactérie chez les mammifères marins préférentiellement dans les poumons qui, plus est, en association avec du parasitisme évoque plutôt une transmission des parasites à l'hôte. Il n'y a aucune publication, à notre connaissance, présentant l'infection de parasites de ruminants par les *Brucella* de mammifères terrestres.

Le cycle des parasites chez les mammifères marins fait intervenir les poissons comme hôtes intermédiaires. La séroprévalence des jeunes mammifères marins augmente brutalement juste après le sevrage impliquant une transmission possible par les proies comme les poissons et les crustacés (Lynch *et al.*, 2011 ; Meegan *et al.*, 2012 ; Lambourn *et al.*, 2013). La

transmission par les proies englobe avec elle la transmission par les parasites puisque les mammifères s'infestent *via* les poissons.

La transmission par la consommation de proies est étoffée par la séroprévalence non nulle des ours polaires, des loutres de mer et des orques, consommateurs de phoques potentiellement infectés (Nymo *et al.*, 2011 ; Tryland *et al.*, 2011).

- Transmission inter-espèce?

Brucella ceti est-elle transmissible aux pinnipèdes et *Brucella pinnipedialis* peut-elle infecter des cétacés ?

Un isolat de *Brucella* de phoque a été classé comme *Brucella ceti* par MLVA sur plus de 290 échantillons testés et correspondants à la préférence d'hôte à laquelle on peut s'attendre. On ne peut cependant pas affirmer avec certitude que c'est une transmission inter-espèce. Il y a l'incertitude de la méthode et le fait que des phoques peuvent avoir un comportement de prédation envers des marsouins notamment et se contaminer par ce biais (Maquart *et al.*, 2009). Dans une étude de 2008, la caractérisation phénotypique et génotypique (par séquençage des gènes *omp2*) n'a pas révélé de différence entre les *Brucella* isolées de phoques et celles de marsouins (Prenger-Berninghoff *et al.*, 2008). Les auteurs ont interprété cela comme une contamination inter-espèce puisque les rapports entre pinnipèdes et cétacés côtiers sont étroits sur les côtes germaniques. Cela ne concerne que deux isolements parmi des centaines qui ont été proprement classés selon la préférence d'hôte. Il faudrait là-encore d'autres études avant d'affirmer une transmission inter-espèce d'autant plus, que cela peut juste évoquer que la préférence d'hôte utilisée pour la classification n'est pas correcte, comme déjà évoqué précédemment.

De manière générale, les voies de transmission de la brucellose sont encore moins comprises chez les pinnipèdes que chez les cétacés. En effet, pour ces derniers, on retrouve la plupart des modes de transmission que nous connaissons pour les animaux terrestres.

e) Prévalence :

La prévalence réelle de *Brucella ceti* et de *Brucella pinnipedialis* n'a pas été établie à cause de la diversité des techniques de laboratoire donnant des pourcentages de faux positifs et de faux négatifs différents et de l'absence d'un test systématique. De plus, la plupart des

tests sont réalisés sur des animaux échoués dont la cause primaire d'échouage n'est pas systématiquement connue (Guzman-Verri *et al.*, 2012).

Une des études la plus importante réalisée jusqu'à aujourd'hui comprend 2470 mammifères marins des océans Atlantique, Pacifique et Arctique et a montré une séroprévalence globale de 4%, tous mammifères marins confondus (Center for Food Security and Public Health, 2009). En Amérique du Nord, sur 1855 pinnipèdes testés, seulement 3,1% étaient séropositifs et en Atlantique Nord, parmi 1386 pinnipèdes et cétacés collectés, 8,2% étaient séropositifs (Tryland *et al.*, 1999 ; McDonald *et al.*, 2006). La plupart des études sont de moins grande ampleur et obtiennent des taux de séroprévalence plus élevés, surtout concernant certaines espèces :

- 35% de phoques à capuchon de l'Atlantique Nord et de la mer de Barent (Tryland *et al.*, 1999) ;
- 49% de phoques veaux-marins en Ecosse ;
- 75% (9/12) de trois espèces de lions de mer et 57% des otaries à fourrure en Australie (Lynch *et al.*, 2011) ;
- 0% (0/101) de lions de mer en Nouvelle-Zélande (McDonald *et al.*, 2006) ;
- 4,7% (2/48) des phoques de Weddell, 65,6% (21/33) des éléphants de mer et 0% des otaries à fourrure en Antarctique (Jensen *et al.*, 2013) ;
- Environ 30% des marsouins communs en Europe du Nord ;
- 31% des dauphins communs au Royaume-Uni ;
- 55,2% (32/58) chez diverses espèces de cétacés ;
- 38% sur 40 petits rorquals du Pacifique Nord et 9% sur 43 baleines de Bryde (Ohishi *et al.*, 2008) ;
- 0% sur 104 petits rorquals d'Antarctique (Ohishi *et al.*, 2008) pouvant suggérer que l'exposition à *Brucella ceti* dans cette zone du globe est faible ;
- 5,4% de séroprévalence chez les ours polaires (Tryland *et al.*, 2001) ;
- 28,1% des loutres de mer sur l'île de Béring et 1,3% en Kodiak (Goldstein *et al.*, 2011) et 7,7% en Alaska ;
- Sur les côtes britanniques, la séropositivité est plus élevée chez les cétacés (31% des marsouins et dauphins communs) que chez les pinnipèdes (8% des phoques veau-marins et 10% des phoques gris).

Il faudrait isoler et caractériser les *Brucella* infectant les loutres de mer et les ours polaires pour connaître l'espèce de la bactérie concernée.

De part cette liste de séroprévalence, on peut s'apercevoir que peu d'études ont été réalisées dans l'hémisphère Sud.

Pour la zone de notre étude, sur 137 marsouins communs échoués en Mer du Nord, la bactérie a pu être identifiée par culture sur milieu de Farell et MLVA chez seulement six animaux soit 4,4% des individus (Alonso-Velasco *et al.*, 2013). Sur la même période, la bactérie a été isolée de 5 phoques communs sur 42 animaux analysés soit une incidence de 11,9% et trois phoques gris sur les 13 analysés soit 23,1% (Alonso-Velasco *et al.*, 2013). Sur les côtes de l'Allemagne, l'incidence de la brucellose a été analysée par culture bactérienne, puis les isolats ont été caractérisés par la distribution des copies *IS711* et PCR-RLFP des gènes *omp2* (Prenger-Berninghoff *et al.*, 2008). Les résultats obtenus par cette étude ont été une incidence de 11% chez les phoques veaux-marins (47/426), 2,9% chez les phoques gris (1/34) et 0,7% chez les marsouins communs.

f) Distribution géographique :

Des animaux infectés ou séropositifs ont été retrouvés majoritairement dans l'océan Atlantique Nord, la Méditerranée, l'océan Arctique et la Mer de Barent (Center for Food Security and Public Health, 2009 ; Hernandez-Mora *et al.*, 2013 ; Jensen *et al.*, 2013). Mais ce ne sont pas les seules régions de la planète concernées, nous pouvons aussi citer les côtes Pacifique et Atlantique de l'Amérique du Nord, le Pérou, l'Australie (Lynch *et al.*, 2011), la Nouvelle-Zélande, Hawaï, les îles Salomon et le Pacifique Nord (Ohishi *et al.*, 2008) (fig.6 et 7). La grande majorité des animaux séropositifs et/ou infectés se trouvent dans l'hémisphère Nord mais cela pourrait être dû à l'échantillonnage plutôt qu'à une réelle distribution de la maladie, la plupart des études étant réalisées dans la moitié Nord de la planète. Dans l'hémisphère Sud, les études sont moins nombreuses probablement la conséquence d'un manque de subventions et de la consommation de la chair des animaux échoués notamment sur les côtes africaines.

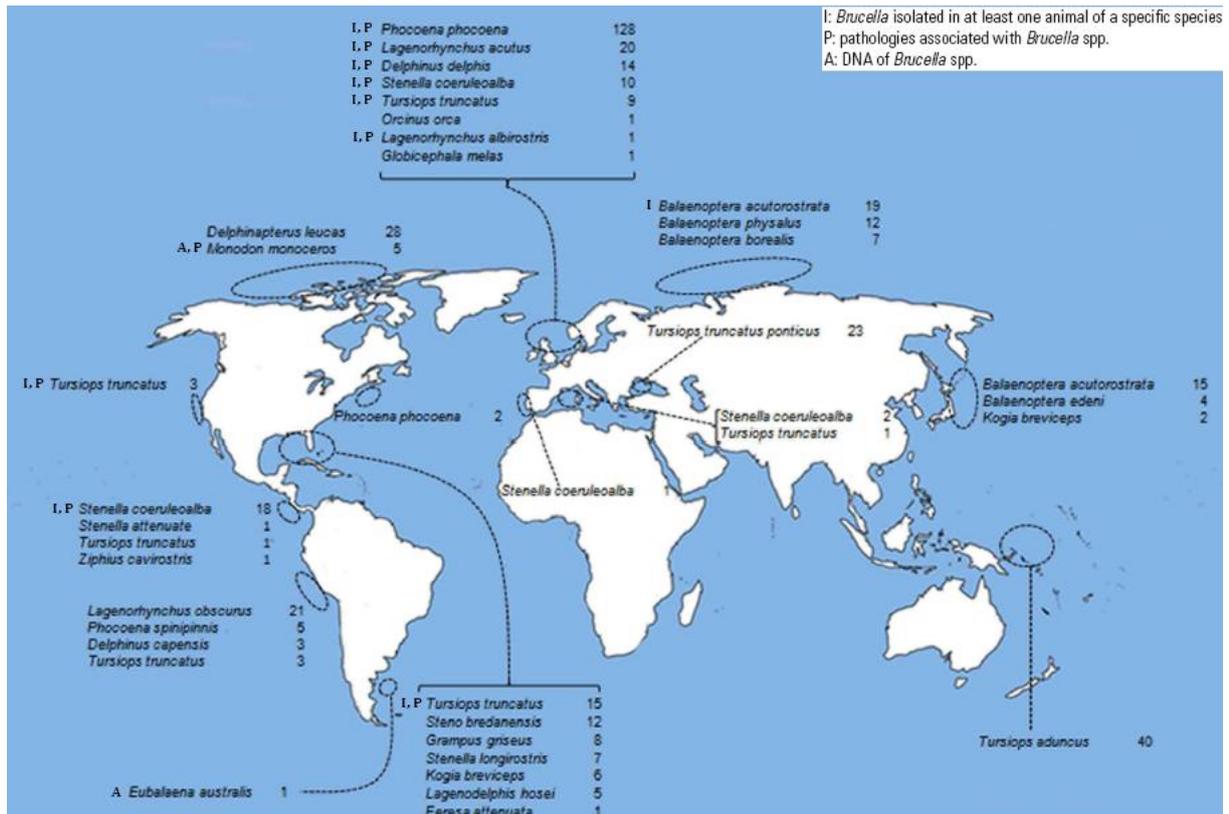
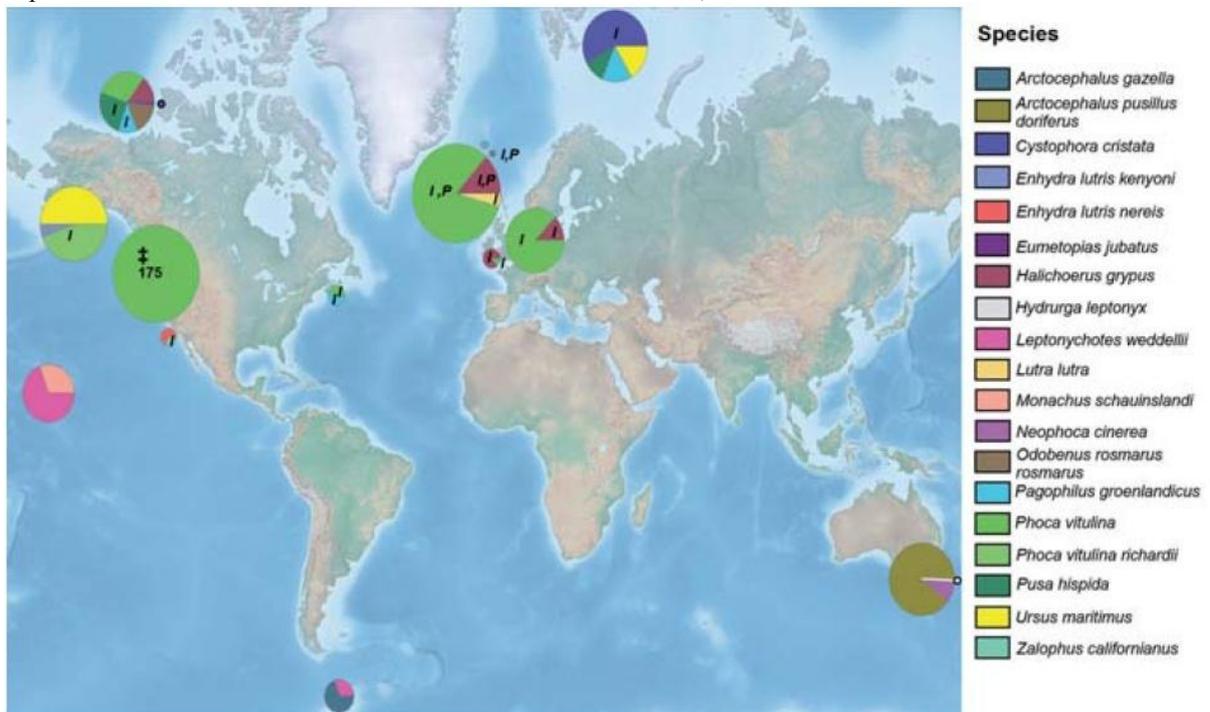


Figure 6: Répartition géographique des cétacés séropositifs et infectés par la brucellose.

I : *Brucella* isolée chez au moins un individu ; P : pathologie due à *Brucella*, A : ADN de *Brucella* spp. détecté (d'après Guzman-Verri *et al.*, 2012 et Hernandez-Mora *et al.*, 2013)



I: *Brucella* isolated in at least one animal of a specific species
P: pathologies associated with *Brucella* spp.
o: one individual studied

‡ 175: number of sera from harbour seals (*Phoca vitulina*) in coastal areas of Washington State (this number is given to enable readers to estimate the number of sera in each sector of each circular graph)

Figure 7: Répartition géographique des pinnipèdes, loutres de mer et ours polaires séropositifs à *Brucella*.

I : *Brucella* isolée chez au moins un individu ; P : pathologie due à *Brucella*, A : ADN de *Brucella* spp. détecté (d'après Hernandez-Mora *et al.*, 2013)

2.2.2. *Signes cliniques*

La période d'incubation de la maladie n'est pas connue. Les signes cliniques ne sont pas spécifiques et de très nombreux animaux sont asymptomatiques. Des signes cliniques n'ont été identifiés que dans des cas sporadiques. De plus, les animaux étudiés sont la plupart du temps des animaux échoués dont les signes cliniques, s'ils étaient présents, n'ont pas pu être observés. Beaucoup d'animaux échoués sont infestés par des parasites et présentent des tableaux lésionnels différents. Les lésions et le parasitisme peuvent être primaire ou secondaire, il est souvent dur de le déterminer (Center for Food Security and Public Health, 2009 ; Godfroid *et al.*, 2010; Guzman-Verri *et al.*, 2012, Hernandez-Mora *et al.*, 2013).

Les taux de morbidité et de mortalité ne sont pas connus (Center for Food Security and Public Health, 2009).

a) Signes cliniques dus à *Brucella pinnipedialis* :

La bactérie est souvent isolée des pinnipèdes apparemment sains. Les animaux chez lesquels la bactérie a été cultivée ou détectée par PCR présentent dans la majorité des cas une pneumonie que les auteurs expliquent comme secondaire à l'infestation parasitaire des voies respiratoires. La brucellose chez les pinnipèdes pourrait être une cause d'avortement mais cet élément reste en suspens. Deux cas ont été décrits chez des lions de mer de Californie où la bactérie a été identifiée et cultivée à partir de deux placentas de femelles ayant avorté (Foster *et al.*, 2002 ; Goldstein *et al.*, 2009 ; Lambourn *et al.*, 2013).

b) Signes cliniques associés à *Brucella ceti* :

- Avortement

Le premier avortement causé par la brucellose chez les cétacés a été décrit en 1994 chez un grand dauphin captif en Californie (Ewalt *et al.*, 1994). Dans ce cas-là, la bactérie a été isolée par culture du placenta et de différents organes de l'avorton. Deux avortements ont été décrits chez des grands dauphins dans les années 90s (Miller *et al.*, 1999). Un avortement dû à *Brucella ceti* a également été suspecté chez un animal échoué sur les côtes belges. L'avortement n'a pas été établi de façon certaine mais la femelle marsouin commun était infectée par *Brucella*, présentait du lait dans les mamelles, sa corne utérine gauche était dilatée et congestionnée et la bactérie a pu être identifiée dans un ulcère cutané génital (Jauniaux *et al.*, 2010).

On pourrait se poser la question de la diminution de fécondité chez les orques exposés à *Brucella ceti* ou *Brucella pinnipedialis* par consommation de phoques qui poserait un problème écologique pour cette espèce classée en annexe II, espèce vulnérable par le CITES (Lambourn *et al.*, 2013).

- Autres signes cliniques

Les *Brucella* ont parfois été isolées d'ulcères cutanés (fig.8) et d'abcès sous-cutanés (Center for Food Security and Public Health, 2009 ; Godfroid *et al.*, 2010; Jauniaux *et al.*, 2010 ; Guzman-Verri *et al.*, 2012, Hernandez-Mora *et al.*, 2013). Des difficultés à la nage et des problèmes d'orientation ont aussi été décrits chez des dauphins présentant une neurobrucellose (Davison *et al.*, 2009 ; Gonzales-Barrientos *et al.*, 2010 ; Guzman-Verri *et al.*, 2012 ; Cassle *et al.*, 2013 ; Hernandez-Mora *et al.*, 2013). Enfin, de la dyspnée a été notée chez un grand dauphin présentant un abcès pulmonaire consécutif à l'infection par *Brucella ceti* (Cassle *et al.*, 2013).



Figure 8: Ulcère longitudinal entre les deux nageoires pectorales chez un marsouin commun infecté par *Brucella ceti*.

(d'après Jauniaux *et al.*, 2010)

Dans la majorité des cas, les études sont réalisées à partir d'animaux échoués dont on réalise l'autopsie. Il est donc très intéressant de connaître les lésions provoquées par la brucellose.

2.2.3. *Lésions post-mortem*

Les lésions *post-mortem* sont intéressantes pour émettre un diagnostic mais aussi pour détecter la bactérie. Pour l'instant, aucune lésion spécifique à la brucellose chez les mammifères marins n'a été décrite. Les lésions que l'on va décrire par la suite sont donc non pathognomoniques.

a) Lésions dues à *Brucella pinnipedialis* :

Aucune lésion due à *Brucella pinnipedialis* n'a été rapportée chez les pinnipèdes infectés par la bactérie (Center for Food Security and Public Health, 2009 ; Godfroid *et al.*, 2010; Hernandez-Mora *et al.*, 2013). La plupart des isolements de *Brucella* à partir de tissus infectés proviennent d'animaux apparemment sains. Si une lésion est associée à l'isolement ou à l'identification de la bactérie, il s'agit principalement d'une bronchopneumonie d'origine vermineuse (Center for Food Security and Public Health, 2009 ; Godfroid *et al.*, 2010; Hernandez-Mora *et al.*, 2013 ; Lambourn *et al.*, 2013). Même pour les cas possibles d'avortement chez les lions de mer de Californie, aucune lésion n'a été rapportée, pas même de placentite, c'est pour cette raison que l'avortement du à *Brucella* est hypothétique (Goldstein *et al.*, 2009).

b) Lésions dues à *Brucella ceti* :

Brucella ceti a été associée à de multiples lésions chez les cétacés, en particulier dans le système nerveux central et les organes reproducteurs.

- Lésions des organes reproducteurs

La principale lésion retrouvée est une placentite nécro-purulente, caractéristique de l'infection par la brucellose chez les mammifères terrestres (Foster *et al.*, 2002 ; Ohishi *et al.*, 2003 ; Hernandez-Mora *et al.*, 2008 ; Maquart *et al.*, 2009 ; Gonzales-Barrientos *et al.*, 2010 ; Lynch *et al.*, 2011). A l'observation lors de l'autopsie, les cryptes des caroncules de placenta infectés sont remplies de débris nécrotiques, les vaisseaux sont hyperhémiques, il y a de la nécrose multifocale des trophoblastes avec perte de la muqueuse du placenta (Miller *et al.*, 1999). Le tropisme de la bactérie pour l'utérus a été affirmé puisqu'un petit rorqual femelle séropositif à *Brucella* du Pacifique Nord a présenté plusieurs granulomes inflammatoires dans l'endomètre utérin (Ohishi *et al.*, 2004). Ces lésions ont révélé microscopiquement des

infiltrations de mononucléaires et des cellules géantes, suggérant une pathologie induite par *Brucella*. Comme chez les mammifères terrestres, les souches de *Brucella* de mammifères marins ont un tropisme pour la mamelle. La brucellose entraîne aussi des lésions de l'appareil génital mâle. Des épидидymites et des orchites ont été décrites chez les cétacés (Hernandez-Mora *et al.*, 2008 ; Gonzales-Barrientos *et al.*, 2010). Par exemple, des orchites granulomateuses et parfois des abcès nécrotiques ont été trouvés chez des petits rorquals et des baleines de Bryde mâles (Ohishi *et al.*, 2008). Cela a aussi été décrit chez des marsouins communs (fig.9) et des dauphins (Dagleish *et al.*, 2008). Un animal a présenté une augmentation de volume d'un testicule associée à de multiples abcès.

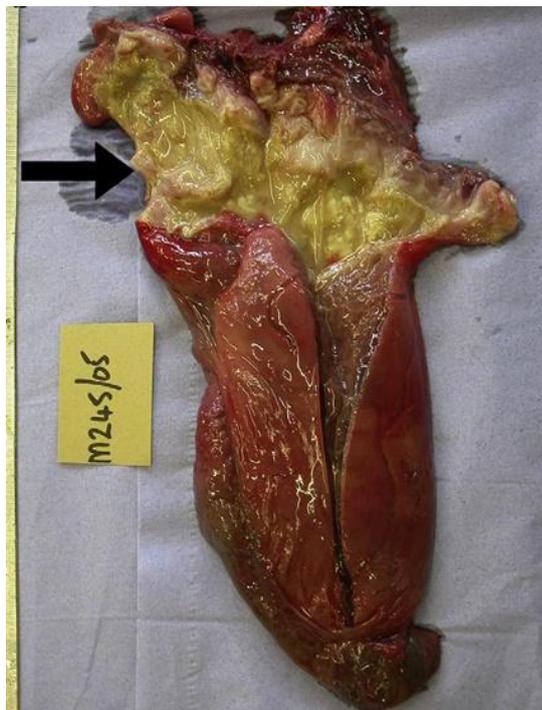


Figure 9: Testicule droit de marsouin commun infecté par *Brucella ceti* présentant un abcès proximal.
(d'après Dagleish *et al.*, 2008)

La localisation de *Brucella* dans les organes reproducteurs mâles et femelles suggèrent fortement une transmission par voie vénérienne et par le lait.

- Lésions dans le système nerveux central

La neurobrucellose n'a été rapportée ni chez les bovins, ovins, caprins et porcins ni chez les canins. Cependant, c'est un cas relativement fréquent de brucellose non traitée chez l'Homme (OIE).

L'espèce présentant le plus fréquemment des signes de neurobrucellose est le dauphin bleu et blanc (Guzman-Verri *et al.*, 2012). Les méninges apparaissent hyperhémiques et une augmentation de volume du liquide céphalo-rachidien ainsi que de sa cellularité sont observées (Hernandez-Mora *et al.*, 2008). Microscopiquement, la lésion se caractérise par une méningite (fig.10) ou méningoencéphalite non suppurative sévère, chronique et étendue, encore plus sévère dans le tronc cérébral (Hernandez-Mora *et al.*, 2008 ; Davison *et al.*, 2013). Cette lésion est associée à un infiltrat inflammatoire de lymphocytes, de macrophages et à de la fibrose (Davison *et al.*, 2013). Des dommages vasculaires ont aussi été décrits avec des hémorragies et des nécroses de l'intima des artérioles (Jauniaux *et al.*, 2010). Dans la plupart des cas, une encéphalite périventriculaire avec infiltration de macrophages a été notée (Gonzales-Barrientos *et al.*, 2010 ; Jauniaux *et al.*, 2010).

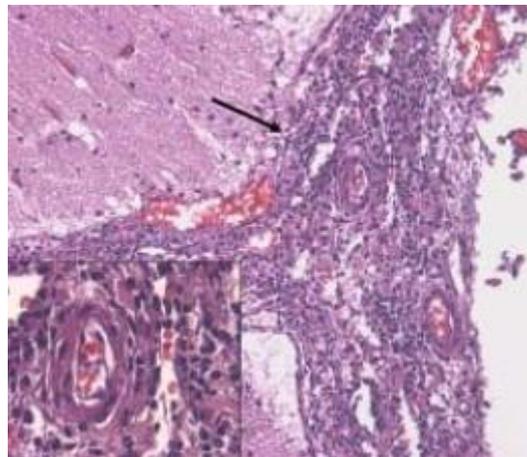


Figure 10: Infiltration des méninges chez un dauphin bleu et blanc du Costa Rica présentant une neurobrucellose.

(d'après Hernandez-Mora *et al.*, 2008)

- Lésions du système cardio-vasculaire

Une femelle dauphin bleu et blanc a développé une endocardite sévère, très ressemblante aux lésions cardiaques que l'on peut observer chez des Hommes infectés par *Brucella* (Gonzales-Barrientos *et al.*, 2010). Cette endocardite est caractérisée par un nodule et de la fibrine sur la valvule mitrale (fig.11). Sa surface présente également des zones de nécrose et de calcification. Microscopiquement, l'infiltrat présente des lymphocytes et des macrophages ainsi que quelques cellules géantes. Les *Brucella* ont été détectées par immunohistochimie (Gonzales-Barrientos *et al.*, 2010).

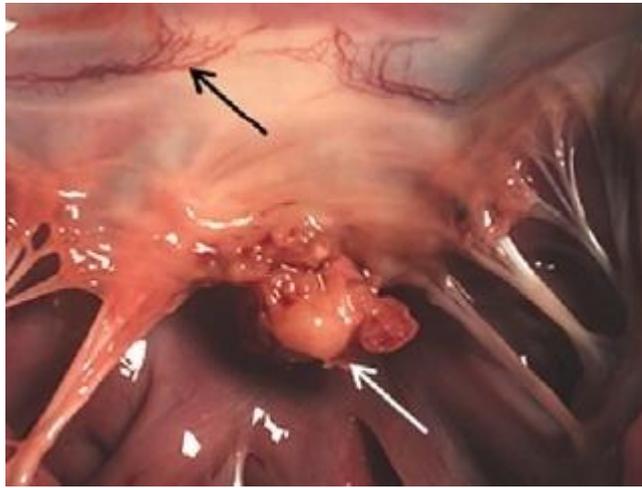


Figure 11: Nodule sur la valvule mitrale et vaisseaux hyperhémiques en zone dorsale de la valvule du cœur chez un dauphin bleu et blanc.

(d'après Gonzales-Barrientos *et al.*, 2010)

- Lésions du système respiratoire

Les *Brucella* sont souvent retrouvées dans les poumons infestés de nématodes (Perrett *et al.*, 2004a ; Dawson *et al.*, 2008a ; Gonzales-Barrientos *et al.*, 2010 ; Davison *et al.*, 2011 ; Guzman-Verri *et al.*, 2012 ; Cassle *et al.*, 2013 ; Hernandez-Mora *et al.*, 2013). Par exemple, chez un marsouin commun échoué, dont *Brucella ceti* avait été isolée des poumons, l'infestation du ventricule droit du cœur et des vaisseaux pulmonaires par des nématodes a été associée à des thrombi pulmonaires et à une pneumonie nécrosante (Jauniaux *et al.*, 2010). D'autres lésions sont décrites comme des bronchopneumonies, des abcès pulmonaires, de l'hyperhémie et des infiltrats lymphocytaires pulmonaires (Perrett *et al.*, 2004a ; Dawson *et al.*, 2008a ; Gonzales-Barrientos *et al.*, 2010 ; Davison *et al.*, 2011 ; Guzman-Verri *et al.*, 2012 ; Cassle *et al.*, 2013 ; Hernandez-Mora *et al.*, 2013). Cependant, même si *Brucella* est communément isolée des poumons, on ne comprend pas bien le lien pathogénique avec cet organe. Enfin, ne pas oublier que dans la majorité des cas, *Brucella ceti* est identifiée ou isolée de poumons apparemment sains (Hernandez-Mora *et al.*, 2013).

Notons que la pneumonie a été décrite comme la pathologie la plus commune chez les avortons suite à l'infection par *Brucella abortus* (Poester *et al.*, 2013).

- Lésions des os et des articulations

Brucella ceti a été isolée de plusieurs lésions des os et des articulations. L'autopsie d'un marsouin commun a révélé une discospondylite non clinique (Gonzales-Barrientos *et al.*, 2010). Dans un autre cas, un mâle dauphin bleu et blanc a présenté une arthrite et une ostéite fibrinopurulente de l'articulation scapulo-humérale droite avec infiltration de la cavité

synoviale par des macrophages et des polynucléaires neutrophiles (Dagleish *et al.*, 2007). Cet animal présentait aussi une neurobrucellose, microscopiquement méningoencéphalomyélite. Enfin, une arthrite de l'atlando-occipital a été décrite chez un dauphin commun à bec court (fig.12) et un dauphin à flancs blancs de l'Atlantique (Davison *et al.*, 2013). Cette lésion était associée dans les deux cas à une neurobrucellose.

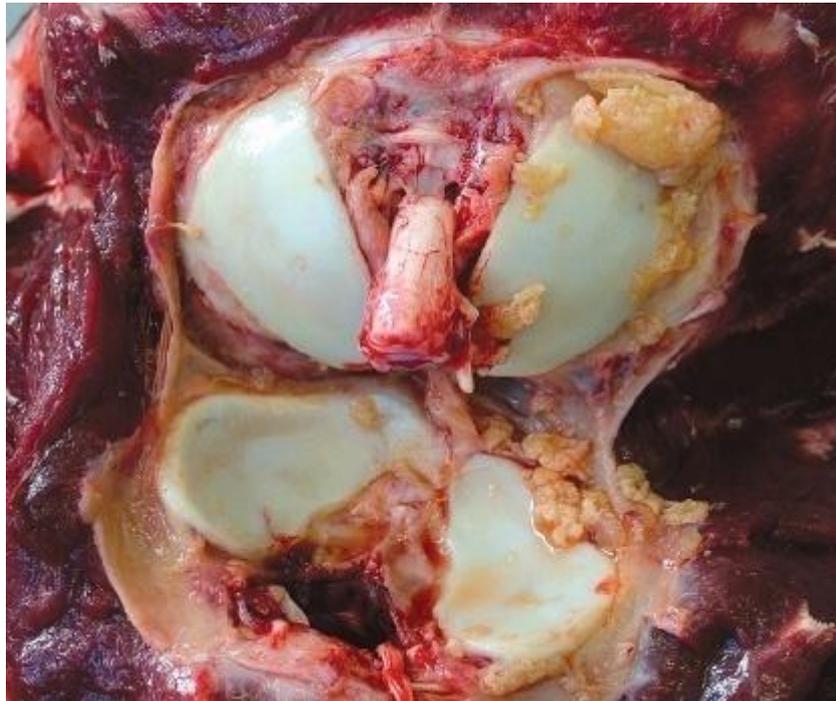


Figure 12: Arthrite de l'articulation atlando-occipitale purulente et caséuse chez un dauphin commun à bec court.
(d'après Davison *et al.*, 2013)

Ce sont des symptômes survenant parfois dans des cas de complications de brucellose humaine (OIE).

- Lésions dans d'autres organes

Les *Brucella* sont des bactéries intracellulaires facultatives du système réticulo-histocytaire. On peut ainsi observer chez les animaux infectés une hépatomégalie, une hépatite, une splénomégalie, des abcès, de la nécrose et des infiltrations de macrophages dans le foie et la rate (Gonzales-Barrientos *et al.*, 2010 ; Guzman-Verri *et al.*, 2012 ; Hernandez-Mora *et al.*, 2013). On peut aussi retrouver des adénomégalies et de la congestion rénale. L'hépatomégalie et la splénomégalie sont des signes d'appel de la brucellose à l'autopsie chez les ruminants domestiques (Gonzales-Barrientos *et al.*, 2010 ; Guzman-Verri *et al.*, 2012 ; Hernandez-Mora *et al.*, 2013).

2.2.4. *Diagnostic de la brucellose*

a) Diagnostic clinique :

Le diagnostic clinique de la brucellose est difficile puisqu'aucun signe clinique n'est spécifique, pourvu qu'il ait été observé par ailleurs. De plus, il n'y a pas de réelle médecine de mammifères marins puisque la majorité de la pathologie est étudiée chez des animaux échoués. Pour des cas d'avortements, que cela soit en captivité ou chez des animaux échoués, il faut suspecter la brucellose et prendre des mesures de biosécurité nécessaires pour les personnes ayant été en contact avec l'animal. *Brucella* est par ailleurs à l'origine de nécrose et d'hépatite donc d'une augmentation des ASAT et des γ GT, parfois découverte chez des animaux séropositifs en captivité (Foster *et al.*, 2002 ; Ohishi *et al.*, 2003 ; Meegan *et al.*, 2012).

b) Diagnostic *post-mortem* et histopathologie :

Lorsqu'un mammifère marin s'échoue, un vétérinaire peut être appelé afin de réaliser l'autopsie de l'animal. Il pourra penser à l'infection par *Brucella* lorsqu'il découvre des lésions évocatrices qui sont celles énumérées précédemment. Cependant, il faut garder à l'esprit que dans la majorité des cas, *Brucella ceti* et surtout *Brucella pinnipedialis* sont isolées d'organes sans lésions macroscopiques ou microscopiques.

Une grande panoplie d'organes peuvent être prélevés afin d'identifier ou d'isoler la bactérie par diverses méthodes de laboratoire. En effet, la bactérie a été isolée dans les organes suivants : poumons, nœuds lymphatiques particulièrement bronchiques pulmonaires préscapulaires et mésentériques, foie, reins, rate, testicules, placenta, utérus, amnios, allantoïde, cerveau, tronc cérébral, peau (si abcès ou ulcères), sang, liquide péricardique, cœur, articulations, épanchement thoracique ou abdominal, lait, glandes mammaires (Godfroid *et al.*, 2010 ; Guzman-Verri *et al.*, 2012).

Parmi tous ces organes, l'isolement et l'identification de la bactérie est le plus fréquemment obtenus à partir des poumons et des nœuds lymphatiques bronchiques (Garner *et al.*, 1997 ; Foster *et al.*, 2002 ; Prenger-Berninghoff *et al.*, 2008).

Il ne faut pas hésiter à prélever plusieurs organes pour réaliser les analyses de laboratoire. Un animal infecté peut présenter des bactéries dans un organe et pas dans un

autre. Il faut également penser à prélever les nématodes pulmonaires puisque la bactérie a été identifiée chez ces parasites (Dawson *et al.*, 2008a ; Jauniaux *et al.*, 2010).

L'histopathologie est intéressante puisqu'elle peut permettre de visualiser la répartition des bactéries dans l'organe et d'identifier les lésions. On fixe préalablement les échantillons d'organes prélevés lors de l'autopsie avant de les mettre en bloc de paraffine afin de réaliser des lames. Pour la coloration, on peut utiliser la coloration classique à l'hématoxyline-éosine et essayer de repérer de petits coccobacilles intracellulaires pouvant évoquer *Brucella* ou réaliser la coloration de Stamp's Ziehl-Nielsen puisque les *Brucella* sont acido-résistantes (Markey *et al.*, 2013). Les bactéries apparaîtront alors rouges sur fond bleu.

Dans la plupart des organes infectés par *Brucella ceti*, on peut apercevoir une infiltration par des macrophages et des lymphocytes, des cellules géantes et des dommages vasculaires (Miller *et al.*, 1999 ; Hernandez-Mora *et al.*, 2008 ; Gonzales-Barrientos *et al.*, 2010 ; Jauniaux *et al.*, 2010 ; Davison *et al.*, 2013).

c) Diagnostic de laboratoire :

Le diagnostic de la brucellose dépend en grande majorité des tests de laboratoire puisqu'aucune lésion n'est pathognomonique.

- Méthodes directes

Cette partie concerne la culture bactérienne qui reste le « Gold Standard » pour affirmer le diagnostic de la brucellose (Sidor *et al.*, 2013). Cependant, il faut être très prudent car les *Brucella* sont des agents zoonotiques. La culture de la bactérie est donc une méthode diagnostique dangereuse qui nécessite de multiples précautions dont un laboratoire de niveau de sécurité 3.

Le milieu de Farrell est un milieu sélectif communément utilisé pour la culture de *Brucella spp.*. La plupart des souches de *B.ceti* sont visibles après 4 jours d'incubation alors que la majorité des souches de *B.pinnipedialis* ne sont visibles qu'après 7 à 10 jours d'incubation. C'est pour cette raison que plusieurs auteurs conseillent d'attendre 14 jours de temps d'incubation avant de conclure. Cependant, attention, quelques souches de *Brucella* de mammifères marins ne se développent pas bien sur ce milieu, ce qui peut amener à une conclusion erronée par faux négatif. On préfère donc des milieux peu sélectifs comme le Blood Agar, le Sérum Dextrose Agar, le Colombia Agar avec 5% de sang de mouton ou le

Brucella-Agar avec 5% de sérum de cheval. L'incubation se fait à 37°C avec 10% de dioxyde de carbone pour leur croissance. Les colonies de *Brucella* apparaissent circulaires de 0,5 à 1 mm de diamètre, convexes, irisées, lisses, brillantes, non hémolytiques et sont translucides et de couleur miel à la lumière (Markey *et al.*, 2013). L'observation microscopique révèle de petits coccobacilles qu'il ne faut pas confondre avec *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila psitacci* et *Coxiella burnetti*. On peut ensuite réaliser différentes expériences de caractérisations phénotypiques, profil biochimique (catalase, uréase et oxidase), lyse par les phages, métabolisme oxydatif, production de sulfure d'hydrogène, sensibilité aux colorants et agglutination sur sérum d'anticorps monospécifiques pour essayer d'identifier la souche impliquée. Les isolats de pinnipèdes peuvent être différenciés de ceux des cétacés par leur besoin en dioxyde de carbone pour la culture, leur temps d'incubation en milieu de Farrell et l'absence de métabolisme du D-galactose (Jacques *et al.*, 2006 ; Godfroid *et al.*, 2010; Guzman-Verri *et al.*, 2012).

- Méthodes sérologiques

Les réactions sérologiques utilisées dans le diagnostic de la brucellose sont nombreuses mais il existe une parenté antigénique avec d'autres germes comme *Francisella tularensis*, *Yersinia enterocolitica* O9 (normalement absente chez les mammifères marins) et *Vibrio cholerae*, à l'origine de fausses réactions positives (Godfroid *et al.*, 2010).

→ Test de coloration au rose Bengale

Ce test est une réaction d'agglutination rapide sur lame, sensible et spécifique. Elle est réalisée au moyen d'une suspension bactérienne (souvent *B.abortus*) colorée au rose Bengale en milieu acide tamponné à pH 3,65 (Guzman-Verri *et al.*, 2012). Ce n'est pas une réaction quantitative. Elle permet juste de détecter les immunoglobulines G. C'est un test rapide, facile à réaliser et qui s'est montré efficace pour détecter les anticorps anti-*Brucella* chez les mammifères marins. Cependant, ce test est inutilisable sur sang hémolysé ce qui pose des problèmes pour les animaux échoués (Guzman-Verri *et al.*, 2012).

→ Tests immuno-enzymatiques ELISA

Tout comme chez les ruminants, l'anticorps détecté dans la plupart des tests sérologiques est celui dirigé contre le lipopolysaccharide de *Brucella* et particulièrement le composant N-formylperosamide (Markey *et al.*, 2013). Dans la plupart des cas, des tests

sérologiques développés pour les ruminants domestiques sont utilisés pour les mammifères marins sur la base que l'antigène immunodominant reste le LPS pour toutes les souches. La difficulté pour établir un test spécifique des mammifères marins est le manque d'animaux certifiés positifs et négatifs afin de déterminer la performance de l'essai. Les ELISA compétitives (cELISA) sont fréquemment utilisées. L'avantage de cette technique est qu'elle est indépendante de l'espèce dans laquelle le sérum a été prélevé et est donc applicable à différents mammifères. Les cELISA utilisent le LPS ou plusieurs antigènes bactériens. Dans une étude expérimentale comparative à partir de sérums d'odontocètes, la cELISA utilisant le LPS comme antigène a montré des résultats variables et une plus faible sensibilité et spécificité que l'ELISA indirecte développée par l'équipe, qui utilise des IgG anti-odontocètes (Hernandez-Mora *et al.*, 2009). L'utilisation de cELISA avec tous les antigènes bactériens semble une technique présentant une bonne sensibilité mais une spécificité faible, révélant moins de positifs que les tests par agglutination (Meegan *et al.*, 2010). Les ELISA indirectes utilisant la protéine G, A ou un combiné des deux pour lier les IgG a été très utilisée pour le diagnostic de la brucellose chez les cétacés (Guzman-Verri *et al.*, 2012). Cependant, dans une étude comparative utilisant des séra d'odontocètes, la gELISA a montré une moins bonne sensibilité et une moins bonne spécificité que les autres tests dont cELISA et iELISA. Il a été montré que les iELISA ont des plus grandes sensibilités et spécificités et sont plus utiles que la cELISA et gELISA pour la détection des anticorps contre le LPS de *Brucella* dans les séra de 17 différentes espèces d'odontocètes (Hernandez-Mora *et al.*, 2009). Cette performance supérieure des iELISA peut être liée à l'antisérum polyclonal qui reconnaît un plus large spectre d'épitopes sur les chaînes lourdes et légères des immunoglobulines des différentes espèces d'odontocètes. La limite à ce test est que les anticorps anti-IgG des odontocètes ne reconnaissent pas les immunoglobulines des mysticètes.

Des études ont démontré que des analyses sérologiques utilisant *B.abortus* diminuaient le nombre de positifs d'à peu près 50% par rapport à des ELISA compétitives spécifiques pour les mammifères marins (Meegan *et al.*, 2010 ; Lambourn *et al.*, 2013).

Dans le cas d'un résultat sérologique avec une méthode ELISA, il convient d'être prudent dans la conclusion. En effet, un résultat négatif n'indique pas l'absence d'une infection passée ou d'une brucellose latente. Un résultat positif ne permet de faire la différence entre une infection active et un taux d'anticorps maintenu élevé après guérison d'une infection (Sidor *et al.*, 2013). Des bactéries ont été retrouvées par culture chez des animaux séronégatifs.

- Détection de la bactérie

→ Immunohistochimie

L'immunohistochimie est une méthode de localisation de protéines bactériennes dans des coupes de tissus par la détection d'antigènes au moyen d'anticorps. Ces anticorps peuvent être monoclonaux (c'est-à-dire dirigés contre un seul épitope antigénique) ou polyclonaux. Dans la plupart des cas, l'anticorps est conjugué à une enzyme (peroxydase) qui peut catalyser une réaction de production de couleur (immunoperoxydase) (Caulet-Maugendre, 1999). Dans les autres cas, les anticorps sont marqués par un fluorophore. Il faut toujours bloquer les peroxydases endogènes avant de commencer les expériences d'immunohistochimie en incubant le tissu à tester dans du peroxyde d'hydrogène (Caulet-Maugendre, 1999). Les études sur les mammifères marins utilisent fréquemment des anticorps polyclonaux obtenus de lapins expérimentalement infectés par *Brucella abortus* ou *B.melitensis* (Miller *et al.*, 1999 ; Hernandez-Mora *et al.*, 2008 ; Gonzales-Barrientos *et al.*, 2010 ; Jauniaux *et al.*, 2010 ; Davison *et al.*, 2013). Les *Brucella* sont retrouvées dans les macrophages et les cellules inflammatoires de divers tissus (nœuds lymphatiques, utérus, placenta (fig.13), rate (fig.14), cerveau, foie et pancréas), surtout dans le poumon, les organes présentant des lésions, les parasites et le lait (Miller *et al.*, 1999 ; Hernandez-Mora *et al.*, 2008 ; Gonzales-Barrientos *et al.*, 2010 ; Jauniaux *et al.*, 2010 ; Davison *et al.*, 2013). Cette technique permet d'identifier la bactérie dans les parasites pulmonaires ce qui est utile dans l'étude de la transmission de la brucellose chez les mammifères marins (Dawson *et al.*, 2008a).

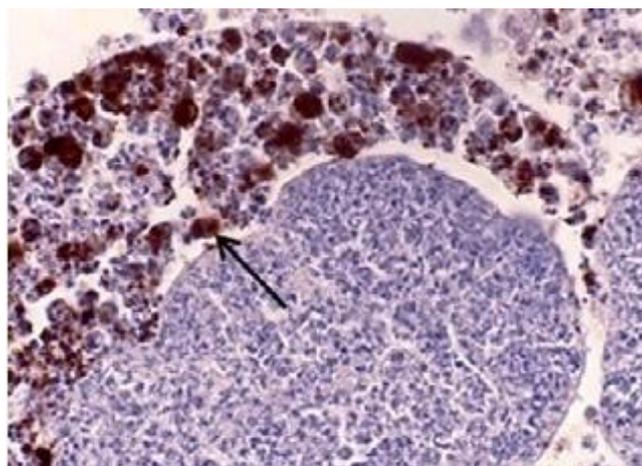


Figure 13: Immunohistochimie marquant un antigène de *Brucella* dans les cellules inflammatoires des villosités placentaires chez un dauphin x40.
(d'après Gonzales-Barrientos *et al.*, 2010)

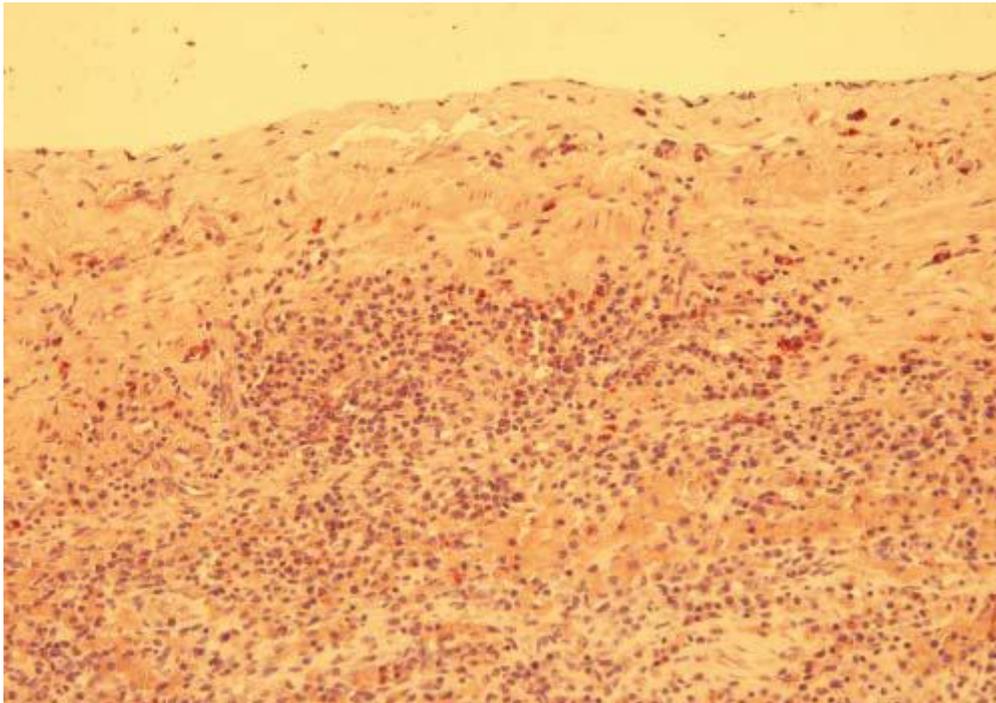


Figure 14: Coloration d'immunohistochimie positive dans les cellules phagocytaires sous la capsule de la rate chez un marsouin commun infecté par *Brucella ceti* x200.
(d'après Jauniaux *et al.*, 2010)

→ Polymerase Chain Reaction (PCR)

C'est une technique de laboratoire de plus en plus utilisée car elle est simple, rapide, peu dangereuse et présente de bonnes sensibilité et spécificité.

Elle permet d'obtenir un nombre important (de l'ordre du million) de copies de la séquence choisie de l'ADN. C'est une méthode d'amplification enzymatique *in vitro*. Il faut connaître les séquences flanquant l'ADN cible afin d'élaborer deux amorces de 15-25 pb (Poitras et Houde, 2002). Ces amorces doivent s'hybrider spécifiquement aux deux extrémités de la séquence à amplifier. Elles servent d'amorces à l'ADN polymérase avec l'extrémité 3'OH libre. L'ADN polymérase la plus fréquemment utilisée est la Taq polymérase provenant de *Thermophilus aquaticus* qui est une bactérie thermostable (jusqu'à 75-80°C). On peut réaliser une électrophorèse pour déterminer le fragment amplifié ou bien réaliser une real time PCR par émission de fluorescence qui ne nécessite pas d'électrophorèse (Poitras et Houde, 2002).

La PCR est très utile pour diagnostiquer rapidement et efficacement l'infection par *B.ceti* et *B.pinnipedialis*. Une méthode PCR très utilisée pour détecter les bactéries du genre *Brucella* cible le gène *bcs31* de 151 pb (adapté à une real time PCR) qui code pour une

protéine de 31 kDa de la membrane chez toutes les espèces de *Brucella* (Jauniaux *et al.*, 2010 ; Godfroid *et al.*, 2010 ; Guzman-Verri *et al.*, 2012). L'amplification est possible jusqu'à 16 jours d'incubation donc même pour des tissus de mauvaise qualité comme on peut l'avoir lors d'échouage (Sidor *et al.*, 2013). En real-time PCR, les deux amorces sont 5'GCTGGTTGCCAATATCAATGC3' et 5'GGGTAAAGCGTCGCCAGAAG3' et la sonde présente la séquence suivante : 5'6FAM-ACTCCAGAGCGCCCGACTTGATCG-DB3' (Jauniaux *et al.*, 2010).

D'autres PCR existent pour amplifier des séquences spécifiques de *Brucella*, ciblant le gène *16S-23S* ou la séquence d'insertion *IS711* spécifique de ces bactéries. La real-time PCR ciblant la séquence *IS711* est d'autant plus intéressante que le nombre de ces séquences est important chez les bactéries de mammifères marins, augmentant ainsi la sensibilité du test (Godfroid *et al.*, 2010).

Afin d'être plus discriminant, il est possible de cibler le gène *bp26*. En réalisant une électrophorèse, on peut affirmer que la bactérie en question est une *Brucella* marine si la taille de l'amplicon est de 1900 pb. Les amorces pour cette PCR sont : 5'GCCCCTGACATAACCCGCTT3' et 5'GAGCGTGACATTTGCCGATA3' (Cloeckert *et al.*, 2001). Il est ensuite possible de réaliser des PCR de type MLVA, MLST ou IRS-PCR afin de typer les bactéries et de pouvoir les classer permettant aussi de faire un lien épidémiologique entre plusieurs cas.

Récemment, des PCR multiplexes ont été développées afin de pouvoir identifier directement l'espèce de *Brucella* impliquée dans l'infection de l'animal. On peut s'attarder ici sur la PCR Bruceladder qui permet de distinguer toutes les espèces de *Brucella* à l'exception de neuf souches sur 21 de *Brucella canis* qui avaient le même profil que *B.suis* (Lopez-Goni *et al.*, 2008). Cependant, *B.suis* n'a jamais été isolée chez un chien. Cette méthode ne permet pas de différencier les différents biovars d'une espèce (Lopez-Goni *et al.*, 2008). Bruceladder se base sur le nombre et la taille de sept produits d'amplification de PCR en se servant de caractéristiques des génomes de différentes espèces de *Brucella* pour réaliser les amorces (Garcia-Yoldi *et al.*, 2006) :

- Une délétion de 25000 pb amenant à la perte du gène *omp31* chez *B.abortus* ;
- Une délétion de 15000 pb comprenant les gènes *omp25b* et *whoAwhoB* chez *Brucella ovis* ;

- Une interruption de la séquence d'un gène *whoA* par la séquence d'insertion *IS711* dans une souche vaccinale de *B.abortus* (RB51) ;
- Une délétion de 702 pb dans le everyopen de la souche vaccinale de *B.abortus* (S19) ;
- Une mutation spécifique du gène *rpsL* de la souche vaccinale Rev1 de *B.melitensis* par rapport à la souche sauvage ;
- Une délétion de 976 pb dans le chromosome I spécifique de *B.canis* ;
- Une délétion de 2200 pb dans le chromosome I spécifique de *B.neotomae* ;
- Un fragment de 2600 pb de *B.suis*, absent de *B.abortus* et *B.melitensis* ;
- Une séquence d'insertion *IS711* en avant du gène *bp26* chez les *Brucella* de mammifères marins.

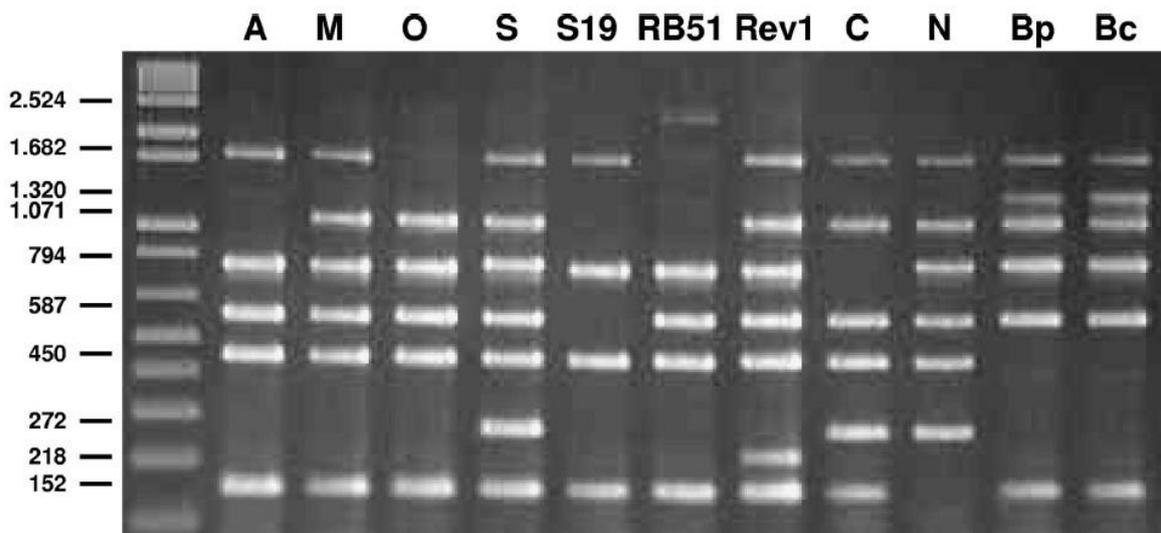


Figure 15: Différenciation de toutes les espèces de *Brucella* et de leurs souches vaccinales S19, RB51 et Rev1 par la PCR multiplexe Bruceladder.

(A)*B. abortus*; (M)*B. melitensis*; (O)*B. ovis*; (S)*B. suis*; (S19)souche vaccinale de *B. abortus* S19; (RB51) souche vaccinale de *B. abortus* RB51; (Rev.1)souche vaccinale de *B. melitensis* Rev.1; (C)*B. canis*; (N)*B. neotomae*; (Bp)*B. pinnipedialis*; (Bc)*B. ceti* (d'après Lopez-Goni *et al.*, 2008)

En ce qui concerne les *Brucella* marines, un fragment de 1320 pb est amplifié tandis qu'une séquence de 450 pb est manquante par rapport aux autres espèces de *Brucella* (fig.15). C'est une technique rapide, sûre et simple de préparation. Cependant, toutes les souches et biovars ne sont pas différenciables. Cette PCR multiplexe vient surpasser la AMOS PCR qui ne permettait pas d'identifier *B.canis*, *B.neotomae*, *B.ceti*, *B.pinnipedialis*, *B.abortus* biovars 3-5-6 et 7 et *B.suis* biovars 2-3-4 et 5 (Garcia-Yoldi *et al.*, 2006).

2.2.5. *Traitement et Prophylaxie*

Un seul traitement a été tenté chez les mammifères marins. Il s'agissait d'un grand dauphin femelle présentant de l'anorexie, de l'apathie et de la dyspnée à cause d'un abcès intra-pulmonaire de trois centimètres de diamètre (Cassle *et al.*, 2013). Dans cette publication, les vétérinaires ont aspiré 20mL de liquide séro-sanguinolent à purulent de l'abcès et ont injecté 20mL d'amikacine (aminoside). L'animal a présenté une amélioration de ses signes cliniques avec une disparition totale de la dyspnée. Une PCR a révélé la présence de *Brucella spp.* dans le contenu de l'abcès. Les vétérinaires ont prescrit de la doxycycline à 2,5 mg/kg BID *per os* et de la rifampicine à 4 mg/kg SID *per os* pendant huit semaines. Ces molécules constituent l'association habituelle pour le traitement de la brucellose, notamment chez l'homme. Dix semaines après disparition des signes cliniques, l'échographie de contrôle a montré que l'abcès avait significativement diminué de taille. Deux ans après que l'animal ait été présenté, l'abcès ne constituait plus qu'une minéralisation focale. Durant ces deux années, le dauphin a toujours présenté des taux d'anticorps élevés (Cassle *et al.*, 2013). Apparemment, le traitement aurait fonctionné bien que l'animal n'ait plus été suivi par la suite.

Cependant, le risque de contamination d'autres espèces et l'impact en santé publique sont tels que l'euthanasie doit être envisagée, tout particulièrement pour un animal vivant en captivité, en contact étroit avec l'homme.

Aucune prophylaxie n'est appliquée pour le moment pour prévenir des infections par des *Brucella* marines ni pour les mammifères marins ou terrestres ni pour l'Homme ce qui pourrait engendrer des contaminations.

2.3. *Brucella marines et autres espèces animales*

2.3.1. *Chez les Poissons*

Le genre de bactérie *Brucella* n'était pas connu pour infecter les poïkylothermes jusqu'à récemment. Des poissons chat du Nil (*Clarias gariepinus*) ont été expérimentalement infectés avec *Brucella melitensis* biovar 3 (Salem *et al.*, 1997). Les poissons ont séroconverti 7 jours après inoculation et la bactérie a pu être isolée par culture de leurs organes internes après autopsie. Cependant, la bactérie n'a pas été transmise aux poissons sentinelles non infectés (Salem *et al.*, 1997).

Dans une étude plus récente de El-Tras *et al.*, 2010, *B.melitensis* biovar 3 a été isolée par PCR du gène *omp2* des organes internes et à partir d'écouvillons de peau chez un poisson chat du Nil séropositif. Ce poisson avait été naturellement infecté par *Brucella* dans la région du delta du Nil en Egypte où des déchets animaliers sont usuellement déversés dans l'eau. Les poissons pourraient ainsi également être sensibles à l'infection par *B.ceti* et *B.pinnipedialis*.

Ces études suggèrent que les poissons pourraient être réceptifs à la brucellose même si leur rôle dans la transmission et/ou comme réservoir de la brucellose dans l'environnement aquatique n'est pas connu.

On peut émettre l'hypothèse d'une transmission aux poissons par les nématodes pulmonaires. En effet, des *Brucella* ont été découvertes dans ces parasites de mammifères marins. Leur cycle évolutif n'est pas bien connu mais il ferait intervenir les poissons *via* l'ingestion de fèces infestés qui pourraient être à l'origine de la contamination des poissons.

S'il était prouvé que les *Brucella* des mammifères marins pouvaient infectés les poissons, cela aurait un impact économique colossal sur l'industrie de la pêche et un impact sur la santé publique significatif. Il est donc impératif de réaliser des études plus approfondies sur ce sujet.

2.3.2. *Chez les mammifères terrestres*

La brucellose chez les ruminants est une maladie infectieuse et contagieuse entraînant de grandes pertes économiques. La brucellose peut causer des avortements, des veaux faibles, de l'infertilité et des baisses de production laitière. C'est pour ces raisons qu'elle est classée comme un danger sanitaire de catégorie 1 en France (autre que *B.ovis* et *B.suis* sérotype 2).

L'inoculation expérimentale par voie veineuse d'une souche de *Brucella* provenant d'un phoque commun du Pacifique a entraîné l'avortement de 2 vaches sur les 3 inoculées 50-56 jours post-inoculation (Rhyan *et al.*, 2001). La bactériologie (culture et immunohistochimie) a révélé la présence des bactéries dans le placenta, le vagin, le tissu mammaire et plusieurs nœuds lymphatiques des deux vaches ayant avorté ainsi que dans les tissus d'un avorton. Les lésions *post-mortem* étaient une placentite nécro-purulente ainsi qu'une endométrite. Les vaches ont toutes séroconverti même si les titres d'anticorps n'étaient importants et durables que chez les deux vaches ayant avorté. Cette étude montre que des *Brucella* provenant de mammifères marins peuvent entraîner la production d'anticorps et

des avortements chez les bovins mais sont moins pathogènes que *B.abortus* dans cette espèce (Rhyan *et al.*, 2001). Une autre étude expérimentale a montré une colonisation de l'organisme mais avec une faible pathogénicité de 3 souches de *Brucella* marines chez des moutons (1 avortement sur 24) (Perrett *et al.*, 2004b).

Plus tard, 10 cochons ont été inoculés avec une souche de *Brucella* marine zoonotique (02/611 ST27) (Bingham *et al.*, 2008). Un titre faible et transitoire d'anticorps a été détecté chez seulement 3 porcs dont deux ont été négatifs à la culture. Les cochons ne se sont pas révélés de bons hôtes pour cette souche de *Brucella* (Bingham *et al.*, 2008).

2.3.3. *Potentiel zoonotique*

La brucellose est une zoonose infectieuse qui se transmet facilement à l'Homme chez qui elle est souvent nommée fièvre de Malte, où elle a été identifiée pour la première fois dans les années 1850 (OIE). L'incidence mondiale de la brucellose humaine est estimée à 500 000 nouveaux cas par an par l'Organisation Mondiale de la Santé. En France, cette maladie est désormais rare (France officiellement indemne depuis 2005), principalement contractée dans les pays tiers où la maladie animale est insuffisamment ou non contrôlée.

Chez l'Homme, la plupart des espèces de *Brucella* provoquent des syndromes similaires. Les infections peuvent être soit asymptomatique soit symptomatique. Dans les cas symptomatiques, la maladie est extrêmement variable et les signes cliniques peuvent apparaître insidieusement ou brusquement. Typiquement, la brucellose humaine commence comme une maladie fébrile aiguë avec des signes grippaux non spécifiques tels que fièvre, maux de tête, malaises, dorsalgie, myalgies à douleurs généralisées. Des sueurs profuses peuvent survenir, en particulier la nuit. Certains patients guérissent spontanément, tandis que d'autres développent des symptômes persistants qui généralement croissent et décroissent dans le temps (OIE). Des complications sont parfois observées incluant de l'arthrite, de la spondylarthrite, de la fatigue chronique, et de l'orchépididymite. Des signes neurologiques (y compris des changements de personnalité, une méningite, une uvéite et une névrite optique), de l'anémie, des abcès internes, de la néphrite, de l'endocardite et de la dermatite peuvent également survenir. D'autres organes et tissus peuvent également être infectés, ce qui entraîne une grande variété de symptômes. Des rechutes peuvent être subies, même dans les cas traités avec succès. Le taux de mortalité est faible; chez les personnes non traitées, les

estimations du taux de létalité varient entre 2% à 5%. Les décès sont généralement causés par une endocardite ou une méningite (OIE).

Les vétérinaires, les éleveurs, les chasseurs et le personnel des abattoirs sont particulièrement exposés à l'infection qui peut être transmise en manipulant les animaux malades, les avortons ou les placentas. C'est aussi une des maladies les plus facilement contractées en laboratoire. Cependant, la consommation de lait non pasteurisé provenant d'animaux infectés est le principal mode de transmission de la maladie à l'Homme. On peut aussi citer la viande voire les animaux infectés chez des personnes dont le métier est en contact avec des animaux hôtes. Quatre des six espèces de *Brucella* connues avant 2007 peuvent se transmettre aux humains : *Brucella melitensis* par les moutons et les chèvres, *Brucella abortus* par les vaches, *Brucella suis* par les porcs et enfin *Brucella canis* par les chiens (OIE).

Le potentiel zoonotique des *Brucella* marines est donc une donnée importante. Le travail en laboratoire a été à l'origine du premier cas humain de brucellose marine en 1999 (Brew *et al.*, 1999). Ce patient, travaillant avec des souches de *Brucella* isolées de mammifères marins, souffrait de céphalées, fatigue et sinusite. La réponse sérologique envers *Brucella* était positive. Des bactéries ont été isolées d'une culture sanguine et identifiées par typage et PCR comme des *Brucella* d'origine marine. Le traitement a consisté en 6 semaines de rifampicine (600mg/jour) et doxycycline (200mg/jour). Le patient n'a présenté aucune complication (Brew *et al.*, 1999).

Trois cas d'infections naturellement acquises ont également été rapportés. Deux de ces cas de brucellose causés par des souches de mammifères marins se sont présentés au Pérou (Sohn *et al.*, 2003) et un en Nouvelle-Zélande (McDonald *et al.*, 2006).

Les deux patients péruviens présentaient tous deux des troubles neurologiques imputables à des masses intra-crâniennes correspondant à des granulomes inflammatoires (Sohn *et al.*, 2003). Le premier patient a consulté en 1985 à l'âge de 26 ans puisqu'il présentait depuis trois mois des douleurs périoculaires, des maux de tête et des convulsions généralisées périodiques. L'examen neurologique a mis en évidence une masse de 5 cm de diamètre dans la région frontopariétale gauche. A la biopsie, elle s'est révélée être un granulome avec des cellules géantes multinucléées. La sérologie pour la brucellose était positive. Il a été traité avec de la rifampicine et des tétracyclines. Le second patient a consulté en 2001 à l'âge de 15 ans pour maux de tête, nausées, vomissements et détérioration

progressive de la vision depuis un an. L'IRM a révélé des masses dans les lobes pariétal et occipital gauche associées à un œdème méningé. Ce patient a été opéré et l'histologie des masses a conclu à des granulomes composés d'un infiltrat lymphohistiocytaire et des cellules géantes. La sérologie pour *Brucella* était négative mais la mise en culture positive. Un traitement contre la brucellose a été prescrit pendant un an. Le patient a présenté d'importantes améliorations mais n'a pas retrouvé toutes ses capacités visuelles. Ces deux patients consommaient des fromages non pasteurisés et parfois du poisson cru mais n'ont jamais été en contact avec des mammifères marins (Sohn *et al.*, 2003). Une neurobrucellose a été diagnostiquée dans les deux cas. C'est une forme d'infection systémique rare et sévère qui présente une grande diversité de signes cliniques. Elle ne survient que chez moins de 5% des patients humains présentant une brucellose (OIE). Les isollements bactériens provenant de ces deux patients ont d'abord été identifiés comme *B.melitensis* mais les tests moléculaires ont par la suite exclu *B.melitensis*, *B.suis* et *B.abortus* biovar 1. Plus tard, une PCR ciblant le gène *bcs₃₁* a été réalisée pour confirmer que les deux bactéries isolées des patients étaient bien des *Brucella*. Par la suite, l'amplification du gène *bp26* et le séquençage du gène *omp2a* ont permis de montrer que les souches provenant des deux patients appartenaient à la même espèce et qu'on pouvait les associer à un échantillon de *Brucella* provenant d'un phoque veau-marin, la souche B2/94 (Sohn *et al.*, 2003). Les souches issues de ces deux cas humains ont donc été rapprochées, à ce moment-là, de *Brucella pinnipedialis* en se basant sur le séquençage du gène *omp2a*. Dans un premier temps, il a été hypothéqué que les phoques ont transmis la brucellose aux troupeaux et que par conséquent, les produits laitiers non pasteurisés étaient contaminés (Sohn *et al.*, 2003).

Le patient de Nouvelle-Zélande a consulté en 2003 à l'âge de 43 ans pour fièvre, rigidité et sensibilité de la région lombaire révélant une ostéomyélite vertébrale (McDonald *et al.*, 2006). La sérologie pour *Brucella* était positive. L'IRM a mis en évidence des zones d'inflammation multifocales de la première à la quatrième lombaire et au niveau de l'ilium droit. La culture du produit d'aspiration de la synovie à l'aiguille fine a conclu à un bacille GRAM négatif. Ces signes cliniques ont d'abord été imputable à *Brucella suis*. Cette identification avait été appuyée par le fait que le patient avait préparé deux porcs tués à la ferme et qu'il n'avait pas consommé de produits laitiers non pasteurisés. Par contre, cette personne consommait du poisson cru (surtout du vivaneau) mais n'a jamais été en contact avec un mammifère marin. Des investigations ultérieures par caractérisation phénotypique et PCR du gène *bp26* ont révélé l'appartenance de la bactérie à des *Brucella* marines. Le

séquençage des gènes *omp2* a montré la présence d'une copie du gène *omp2a* et une copie du gène *omp2b* correspondant à des *Brucella* marines et plus particulièrement à la souche F5/99 isolée d'un avorton de grand dauphin. Cette ressemblance a été confirmée par l'empreinte génétique des séquences *IS711* et du gène *omp25*. Phylogénétiquement, les isolats humains et celui du grand dauphin F5/99 sont proches de ceux de phoques veaux-marins (mais ils ne possèdent pas de copie du gène *omp2b*). Ce patient de Nouvelle-Zélande est le second rapport d'infection naturellement survenue chez un humain (McDonald *et al.*, 2006). Ces différents travaux nous ont présenté des cas de brucellose zoonotique impliquant des souches d'origine marine. Aucun cas n'a été formellement imputable à *B.ceti* ou *B.pinnipedialis*. C'est une autre souche de *Brucella* marine retrouvée également chez un grand dauphin qui a avorté sur la côte américaine (le génotype ST27).

Au contraire des trois cas naturellement infectés, la personne travaillant dans le laboratoire présentait une brucellose peu sévère et sans complication. L'analyse par séquençage de multilocus a révélé que les trois isolats des cas naturellement acquis de brucellose partagent le même génotype, ST27 (Whatmore *et al.*, 2008). Or, dans les études (dont Macquart *et al.*, 2009), le génotype ST27 n'a été retrouvé que chez l'avorton d'un grand dauphin de la côte Ouest des Etats-Unis dont la souche F5/99 a été isolée. La souche isolée de la personne travaillant en laboratoire appartient au génotype ST23, des *Brucella ceti* principalement associées aux marsouins, ce qui corrobore avec son étude. Il est clair que les trois cas humains naturellement infectés par des *Brucella* marines sont étroitement liés. Ce génotype ST27 est rare dans l'échantillothèque probablement parce que les échantillons analysés proviennent surtout de l'hémisphère Nord. Ainsi, ce génotype ne se retrouve peut être que dans l'hémisphère Sud. Cela pose aussi la question d'un potentiel zoonotique plus important de ce génotype par rapport aux autres. Aucun des trois patients n'a rapporté de contact avec des mammifères marins mais ont consommé tous les trois du poisson cru (Whatmore *et al.*, 2008). La question de la transmission de la brucellose par les poissons serait, si elle est réelle, un vrai problème de santé publique qui pourrait entraîner des mesures drastiques sur l'industrie de la pêche.

Ces cas zoonotiques, peu nombreux mais réels, permettent de mettre en lumière la variabilité des symptômes pouvant survenir suite à l'infection par une *Brucella* d'origine marine et ainsi d'émettre l'hypothèse d'un sous-diagnostic de cette zoonose. En effet, dans les différentes études, les symptômes peuvent être modérés comme de la fatigue, des maux de tête et des sinusites mais peuvent aussi s'avérer plus sévères avec des troubles neurologiques

ou une ostéomyélite vertébrale. Rappelons aussi que les symptômes de la forme classique sont assez frustrés et difficiles à diagnostiquer. Il est clair que le potentiel zoonotique des *Brucella* marines est présent et qu'un sous-diagnostic semble réel. De plus, si la souche la plus zoonotique est présente exclusivement dans l'hémisphère Sud, cela correspond à de nombreux pays sous-méditerranéens.

In vitro, des souches de *Brucella pinnipedialis* sont capables de pénétrer dans les macrophages humains mais ne serait pas capable de s'y multiplier. Ce qui démontre le bas potentiel zoonotique des souches testées dans cette étude (Larson *et al.*, 2013).

Ce potentiel zoonotique doit être pris en considération. En effet, encore de nos jours, de nombreuses personnes se nourrissent de mammifères marins et pourraient être contaminés par une viande trop peu cuite. Les personnes chassant ces mammifères peuvent aussi être infectées lorsqu'ils préparent la carcasse pour la consommation. D'autres groupes de personnes sont à risque à cause de leur contact potentiel avec un mammifère marin infecté comme les vétérinaires, les zoologues, les pêcheurs, les scientifiques, le personnel de zoo ou encore toute personne entrant en contact avec un mammifère marin échoué sur une plage. La contamination des poissons et des troupeaux est très préoccupante pour le régime alimentaire de l'Homme. D'autant plus que des troupeaux peuvent être en contact avec des phoques dans certains pays ou que des oiseaux marins peuvent amener sur les côtes des débris de placenta ou de tissus fœtaux contaminés. L'impact pour l'industrie de la pêche est d'autant plus important que les trois cas humains naturellement infectés par une *Brucella* marine ont consommé du poisson cru avant d'exprimer les signes cliniques de la maladie. De part toutes ces voies possibles de contamination, il apparaît que la brucellose marine chez l'homme doit être sous-diagnostiquée ou présenter une pathogénicité moins forte que certaines souches de *Brucella* terrestres.

3. Problématique

La brucellose chez les mammifères marins est une maladie bactérienne découverte récemment. Deux espèces différentes sont pour le moment reconnues, *Brucella ceti* et *Brucella pinnipedialis* selon leur préférence d'hôtes, même si les recherches actuelles tendent à remettre cette classification en doute. Pour le moment, la plupart des études sur la brucellose marine sont réalisées dans l'hémisphère Nord mais aucune recherche n'a été faite en France qui présente pourtant 5000 km de littoraux et de nombreux échouages de mammifères marins chaque année. Ces échouages représentent une attraction pour le public et ainsi de nombreuses personnes, professionnelles ou non, se trouvent en contact avec des cadavres de mammifères marins. *Brucella pinnipedialis* n'est pas connue comme causant des avortements chez les pinnipèdes, pourtant, son importance dans les échecs de reproduction devrait être investiguée. Des études doivent être menées pour détecter des lésions dues à la brucellose chez ces phocidés. Peut-être que certaines souches de *Brucella* marines sont très bien adaptées à certains hôtes qui joueraient ainsi le rôle de réservoir primaire. On peut citer le marsouin commun qui présente fréquemment des anticorps anti-*Brucella* mais dont la pathologie est restreinte à quelques cas. Au contraire, le dauphin bleu et blanc semble très sensible à la brucellose, en témoigne les nombreux cas de pathologies sévères sous différentes latitudes. Probablement que certaines souches de *Brucella ceti* et *Brucella pinnipedialis* sont plus virulentes que d'autres, notamment la souche ST27 pour l'aspect zoonotique de la maladie. Enfin, les données sur la transmission des *Brucella* dans la faune marine n'est que très peu élucidée. Les parasites semblent y jouer un rôle déterminant. Leur implication dans la transmission de la bactérie pousse à se questionner et à étudier le rôle des poissons dans le cycle infectieux.

Les échouages de mammifères marins permettent d'obtenir des données biologiques difficiles à acquérir par d'autres moyens. Le suivi des populations en mer est en effet complexe à réaliser et la prise d'échantillons l'est encore plus. Ainsi, les buts de cette thèse sont doubles. Dans un premier temps, nous analyserons les échouages de mammifères marins sur les côtes françaises de la Manche de 1995 à nos jours et leurs causes pour pouvoir améliorer la protection de la faune marine. Le deuxième but est, à partir des mammifères marins échoués, de rechercher *Brucella* dans les échantillons collectés lors de l'autopsie afin d'objectiver la présence ou l'absence de la bactérie dans nos eaux, de sa pathologie dans le but de protéger les mammifères marins et la santé des populations puisque *Brucella* est une

bactérie zoonotique. En effet, faute de cadre et de moyens, aucune stratégie d'échantillonnage n'est aujourd'hui appliquée, seuls quelques animaux font l'objet d'une recherche plus approfondie de pathogènes d'où l'intérêt de cette étude à plus grande échelle.

RESULTATS

1. PARTIE 1 : Etude rétrospective des échouages et des causes de mortalité des mammifères marins sur les côtes françaises de la Manche de 1995 à 2015

Aucun marsouin commun échoué en 2015 n'est inclus dans cette étude faute d'archivage et un seul phoque veau-marin échoué en 2015 est inclus dans cette étude car autopsié lors de la réalisation de ces expériences.

En France, 14 204 cétacés se sont échoués entre 1995 et 2014 sur les trois façades maritimes (Atlantique, Manche-Mer du Nord et Méditerranée) dont environ 2 950 sur les côtes françaises de la Manche (Van Canneyt *et al.*, 2015). Sur cette façade, la majorité des échouages sont représentés par les marsouins communs avec 1 430 échouages entre 1995 et 2014. Les dix dernières années, la moyenne des échouages est estimée en moyenne à 800 par an. Bien qu'il y ait des fluctuations, il y a une tendance globale à l'augmentation des échouages de mammifères marins. Une augmentation sévère de 50% est survenue en 2011 (1 036 échouages contre 590 en 2010), 2012 (1 234) et 2013 (1 373) avec une diminution légère en 2014 (1 129) mais toujours bien au-dessus de la moyenne habituelle (fig.16). Depuis une vingtaine d'années, les échouages de marsouins communs augmentent drastiquement. La tendance est similaire pour les phocidés avec 1 921 phoques échoués de 1995 à 2014 en France dont 637 phoques veaux-marins (Van Canneyt *et al.*, 2015). Deux pics d'échouages sont repérables, un en hiver correspondant aux échouages de phoques gris et un en été pour les échouages de phoques veaux-marins (fig.17) (Van Canneyt *et al.*, 2015).

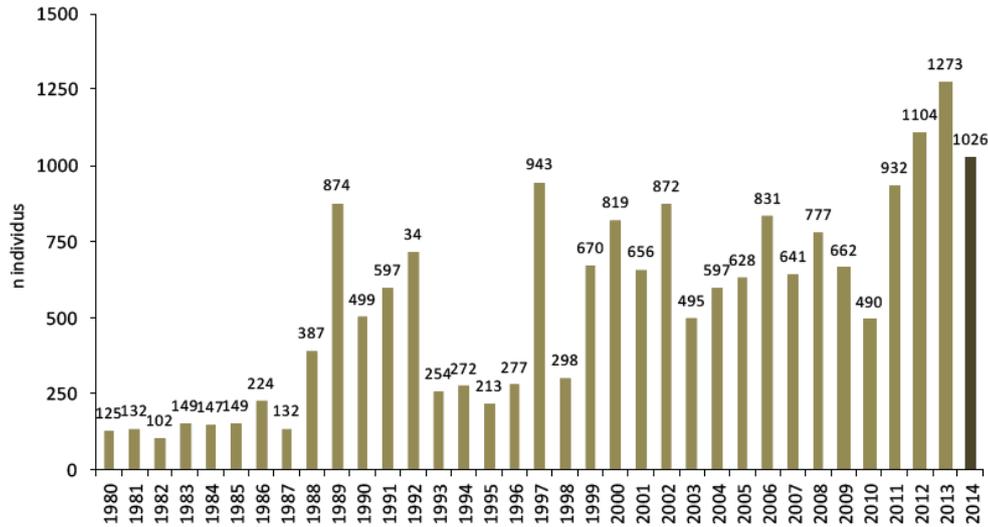


Figure 16 : Distribution annuelle des effectifs d'échouages de cétacés sur le littoral français de 1980 à 2014 (n = 18 959).
(Van Canneyt *et al.*, 2015)

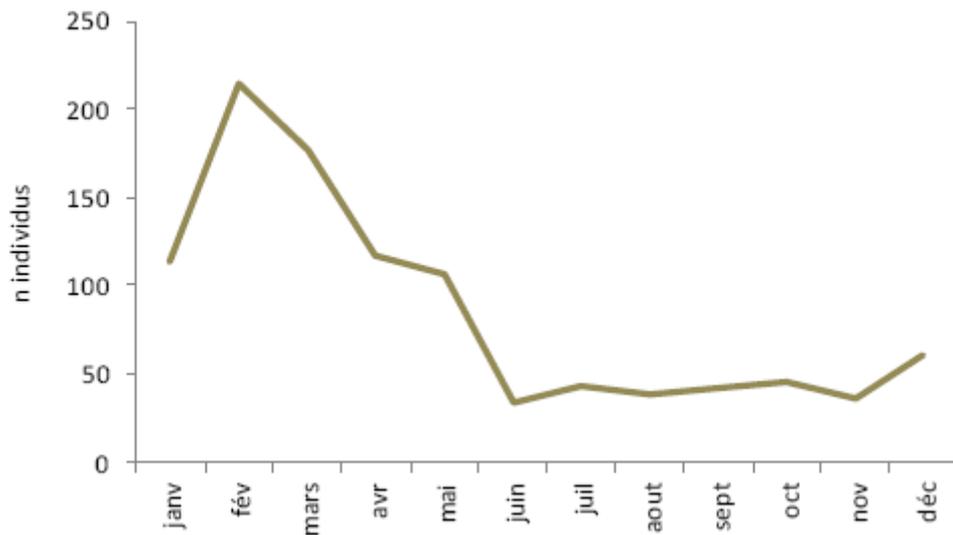


Figure 17 : Distribution intra-annuelle des échouages de cétacés sur l'ensemble du littoral en 2014 (n=1 026).
(Van Canneyt *et al.*, 2015)

Les menaces les plus lourdes pesant aujourd'hui sur les petits cétacés et les phocidés sont les captures par filets de pêche et la pollution chimique de nos eaux. La collision avec des bateaux présente un danger supplémentaire pour les grands cétacés. Enfin, il ne faut pas oublier qu'un grand nombre de cétacés sont aujourd'hui classés en annexe I (espèces menacées d'extinction) ou II (espèces pouvant être menacées d'extinction) par le CITES

(Robineau, 2005). L'étude des causes de mortalité devient une nécessité pour permettre leur conservation.

L'objectif de cette partie est de présenter l'évolution des échouages sur les côtes françaises de la Manche, dans le but d'observer des tendances à l'amélioration ou à la détérioration des conditions de vie des mammifères marins. Il sera aussi intéressant de cibler une population particulièrement touchée. Enfin, le troisième objectif est de savoir s'il est possible de relier ces échouages et leur évolution à des causes précises.

Ici, nous ne nous intéressons pas à tous les mammifères marins échoués en France mais seulement à ceux échoués sur les côtes françaises de la Manche et ayant fait l'objet d'une autopsie à la Faculté Vétérinaire de Liège. Notre étude ne représente donc qu'un petit échantillon de l'ensemble des animaux qui se sont échoués durant cette période. Néanmoins, il s'agit dans la plupart des cas d'animaux en bon état de conservation permettant d'identifier la cause probable de la mort. Ils constituent ainsi un échantillon représentatif de la situation globale.

1.1. Matériel et Méthodes

1.1.1. *Collecte des échantillons*

Les populations de mammifères marins des côtes françaises sont suivies, en termes d'abondance relative, de paramètres démographiques et écologiques et de causes de mortalité au moyen du Réseau National d'Echouage (RNE). Ce réseau couvre toutes les côtes de France Métropolitaine dont les différentes façades maritimes avoisinent les 5000 kilomètres. Il est composé de plus de 200 bénévoles intervenants sur seulement 300 à 1000 échouages par an (Van Canneyt *et al.*, 2015). Ce rassemblement de personnes et d'organismes compétents a pour objectif principal de collecter les informations relatives aux échouages de cétacés et de pinnipèdes. Le RNE est aujourd'hui coordonné par le Centre de Recherche sur les Mammifères Marins (CRMM) à La Rochelle. Depuis 2004, le CRMM est intégré à l'Université de La Rochelle (observatoire-pelagis.cnrs.fr). L'Observatoire Pelagis assure alors la coordination scientifique du RNE. Le CRMM a pour objet de constituer un observatoire à long terme des populations de mammifères marins, d'évaluer les menaces qui pèsent sur ces espèces et d'apporter des propositions de gestion aux administrations concernées. Le CRMM coordonne cet ensemble au compte de l'Etat (pelagis.com).

En Belgique, la gestion des mammifères marins échoués sur les côtes dépend de l'Unité de Gestion de Modèle Mathématique de la Mer du Nord (UGMM). Depuis 1990, une collaboration existe entre l'UGMM et le Service de Pathologie de l'Université de Liège afin que tous les animaux échoués soient analysés. Il s'agit du projet MARIN (Marine Animals Research and Intervention Network) dont le but est une approche multidisciplinaire (vétérinaires, biologistes, toxicologistes) des causes de mortalité des mammifères marins échoués. Ce projet est subventionné au travers de plusieurs autres programmes de recherche scientifiques qui émanent de la Politique Scientifique Fédérale Belge. Plus particulièrement, dans la cadre du projet MARIN, les tâches suivantes sont réalisées :

- Collecte des animaux échoués sur le littoral ;
- Détermination de l'espèce et du sexe ;
- Autopsie suivant un protocole agréé et examen pathologique et histologique ;
- Evaluation des lésions ;
- Examen, et si possible identification des parasites infestant les animaux ;
- Échantillonnage des organes, tissus, parasites et expédition des échantillons pour des recherches complémentaires telle que microbiologie, bactériologie, virologie, toxicologie, parasitologie ;
- Prélèvement du contenu stomacal ;
- Prélèvement des dents chez les odontocètes afin de déterminer leur âge.

En 1995, un accord a été établi entre les représentants du Réseau National d'Echouage de France et le service de pathologie de la Faculté Vétérinaire de Liège afin de réaliser les autopsies de mammifères marins échoués de la frontière belgo-française à la baie de Somme, représentant à peu près 180 km de plage, à l'ULg (Université de Liège). La collecte et le transport des animaux vers Liège ont pu être réalisés grâce à des intervenants du RNE, plus particulièrement la Coordination Mammalogique du Nord de la France Groupe Mammifères Marins (Graveline), la Ligue Protectrice des Animaux du Nord (Calais), l'Office National de la chasse et de la faune sauvage, Picardie Nature (Amiens) et la Société Protectrice des Animaux de Dunkerque. C'est pour cette raison que notre étude commence à partir de 1995.

1.1.2. *Protocole d'autopsie des mammifères marins*

Pour chaque mammifère marin échoué, réceptionné en salle d'autopsie de la Faculté Vétérinaire de Liège, un rapport d'autopsie compilant toutes les données connues sur

l'individu est rédigé. Un numéro d'autopsie est attribué à chaque animal. Toutes les autopsies ont été réalisées selon un protocole standard d'investigation *post-mortem* des cétacés et des pinnipèdes (Jauniaux *et al.*, 2002). Dans chaque rapport est notifié : la date et le lieu d'échouage s'ils sont connus ainsi que des données individuelles déterminées lors de l'examen *post-mortem*. Nous pouvons ainsi connaître: l'espèce, le sexe de l'animal, la longueur totale du corps, le poids ainsi que la cause probable de la mort déterminée à partir du tableau lésionnel (tableau 8). Toutes les lésions décrites dans le tableau ne sont pas forcément présentes. Il convient aussi de déterminer le code de conservation de l'animal (tableau 9) qui décrit l'état de fraîcheur de l'individu et conditionne la collecte des échantillons et l'interprétation des lésions. Le tableau 10 rapporte les codes de décomposition requis pour que l'échantillon soit utilisable. Un intérêt particulier est par ailleurs donné quand à l'identification des différents échantillons.

Plus en détails, lors de l'examen externe, on prêtera particulièrement attention à l'état d'embonpoint estimé selon l'épaisseur de graisse sous-cutanée et l'aspect des muscles. En bon état d'embonpoint, l'épaisseur de lard est importante et les muscles sont plutôt rebondis. En cas d'émaciation, le lard sous-cutané est présent en faible quantité, les muscles sont creusés et on peut voir une dépression derrière la tête et sur la colonne vertébrale qui devient facilement palpable. La peau est examinée avec précaution pour relever les lésions et les parasites éventuels. Les orifices corporels sont soigneusement inspectés pour la présence d'écoulement, de lésions et de parasites. Une attention particulière est portée à l'examen de l'oreille interne et des sinus péri-tympaniques, les parasites éventuels étant collectés. Chez les femelles, la glande mammaire est observée et prélevée ainsi que le lait éventuellement présent. Lors de l'examen interne, l'animal est placé en décubitus latéral droit s'il s'agit d'un petit cétacé et en décubitus dorsal s'il s'agit d'un pinnipède. Chez les cétacés, l'ouverture est réalisée longitudinalement depuis le cou jusqu'à l'anus d'une part et, dans la partie supérieure du flanc, au niveau des apophyses transverses. Chez les pinnipèdes, l'incision est réalisée sur la ligne médiane de l'espace inter-mandibulaire à la symphyse pubienne. Le péritoine est observé afin de détecter d'éventuels kystes de parasites. De manière générale, pour les cavités abdominale et thoracique, tout liquide doit être décrit et prélevé, tous les organes doivent être examinés *in situ* et après extraction, avant et après incision. Une attention particulière est prêtée aux parasites dans les organes et les vaisseaux sanguins. Si des parasites sont présents, ils doivent être prélevés (Jauniaux *et al.*, 2002).

Tableau 8: Cause de mortalité probable en fonction des lésions macroscopiques observées lors de l'autopsie d'un mammifère marin.

| Cause probable de la mort | Tableau lésionnel à l'autopsie |
|--|--|
| Capture accidentelle par les filets de pêche | Lacérations cutanées, traces de filets ou amputations Bon état d'embonpoint Hématomes sous-cutanés Contenu stomacal Œdème et congestion pulmonaire |
| Infection | Evidence de lésions inflammatoires aiguës et/ou chroniques |
| Emaciation | Epaisseur de lard faible ou nulle Fonte musculaire Tube digestif vide Œdème pulmonaire Par élimination des autres causes de mortalité |
| Autres | Tumeur Trauma Prédation Etc |

(d'après Jauniaux *et al.*, 2002)

Tableau 9: Code de conservation en fonction des observations *post-mortem*.

| Code de conservation | Observations d'autopsie |
|----------------------|---|
| CC1 | <p>Extrêmement frais (échoués vivants) :</p> <ul style="list-style-type: none"> Carcasse non gonflée Rigidité cadavérique possible Séparation du sérum Membranes cutanéomuqueuses intègres Œil non vitreux |
| CC2 | <p>Frais :</p> <ul style="list-style-type: none"> Œil vitreux Pas de séparation du sérum Viscères intacts, non distendus par les gaz de putréfaction Absence de protusion de la langue et du pénis |
| CC3 | <p>Décomposition légère :</p> <ul style="list-style-type: none"> Carcasse gonflée Détachement de la partie supérieure de la peau Altérations légères d'organes Protrusion de la langue et du pénis Viscères distendus par les gaz de putréfaction |
| CC4 | <p>Décomposition avancée :</p> <ul style="list-style-type: none"> Ecoulement de liquide par les orifices corporels Détachement de lambeaux cutanés sur de grandes surfaces corporelles Altérations sévères des organes (modification de la couleur, de consistance, etc) Certains viscères sont non identifiables |
| CC5 | <p>Carcasse non identifiée ou fragmentaire :</p> <ul style="list-style-type: none"> Disparition des organes |

(Jauniaux *et al.*, 2002)

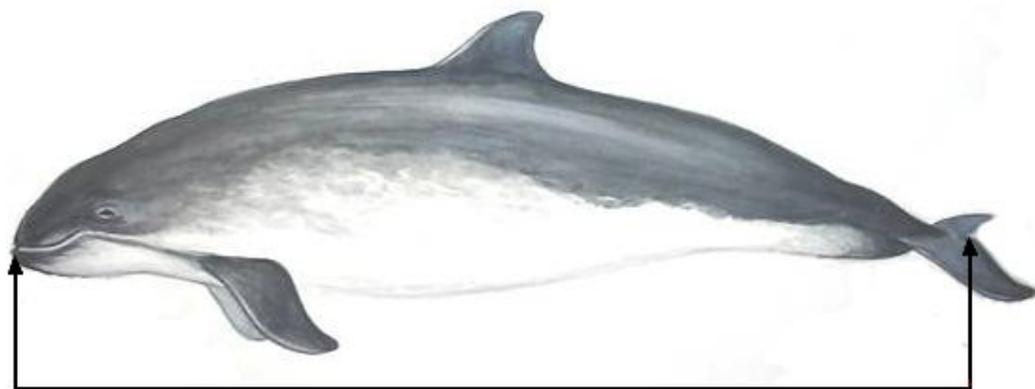
Tableau 10: Pertinence des échantillons en fonction du code de conservation de la carcasse.

| ANALYSE | CODE DE CONSERVATION |
|--|-----------------------------|
| Histopathologie et immunohistopathologie | 1-2 |
| Virologie | 1-2 |
| Bactériologie | 1-2 |
| Parasitologie | 1-3 |
| Toxicologie | 1-2 |
| Microscopie électronique | 1 |
| Biochimie | 1-2 |
| Biologie moléculaire | 1-5 |
| Analyse biologique (âge, proies, etc) | 1-5 |

(d'après Jauniaux *et al.*, 2002)

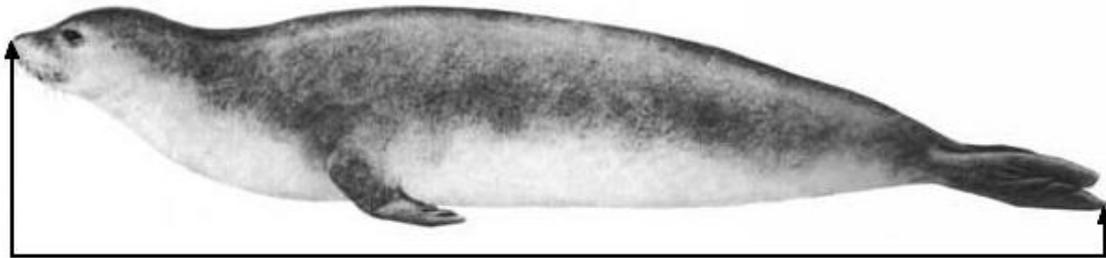
Pour la présente étude, nous nous sommes intéressés à différentes données morphologiques sur les mammifères marins autopsiés depuis 1995, extraites directement des rapports d'autopsie archivés. Ici, nous nous sommes particulièrement intéressés à:

- La date et le lieu d'échouage puisque nous nous concentrons sur les animaux échoués en France ;
- Le sexe de l'individu ;
- L'âge de l'animal ;
- La longueur totale de l'individu a été obtenue en mesurant la distance, en cm, allant du rostre à l'encoche de la nageoire caudale pour les cétacés (fig.18) et du museau au bout des nageoires caudales pour les pinnipèdes (fig.19) ;
- Le poids corporel, en kg, mesuré grâce à une balance ;
- L'épaisseur de lard dorsal sous-cutané, en mm, mesuré grâce à une règle ;
- Les lésions macroscopiques, décrites par un vétérinaire pathologiste lors de l'autopsie ;
- La cause probable de la mort.



Longueur totale

Figure 18: Mesure de la longueur totale d'un marsouin commun.



Longueur totale

Figure 19: Mesure de la longueur totale d'un pinnipède.

1.2. Particularité anatomique des cétacés

Précisons une particularité anatomique des cétacés pour une meilleure compréhension ultérieure : leur estomac pluriloculé et comportant typiquement trois poches. L'œsophage débouche à l'extrémité antérieure dans un sac piriforme, à épaisse paroi musculaire, appelé estomac mécanique ou estomac antérieur ou encore estomac œsophagien. Les plis longitudinaux de la muqueuse œsophagienne sont remplacés par un système de plis plus ou moins réticulés d'aspect blanchâtre. La paroi de ce premier estomac ne présente pas de formation glandulaire. Il sert de réservoir aux aliments qui y subissent un broyage mécanique et une autolyse rapide du fait de la température qui y règne. Cet estomac est très important pour le broyage des aliments vu que les cétacés ne mâchent pas leur nourriture. Il n'existe pas de véritable sphincter entre cet estomac et l'estomac principal. Ce dernier présente une paroi beaucoup plus mince (diminution de la musculature) dont la muqueuse rougeâtre est recouverte de mucus. L'estomac principal est le siège de la digestion chimique, grâce à la

sécrétion de sucs digestifs (fig.20). Les aliments terminent enfin dans l'estomac pylorique. L'estomac principal et l'estomac pylorique communiquent par un étroit conduit, le canal intermédiaire, beaucoup mieux différencié chez les odontocètes que chez les mysticètes. La structure tubulaire de ce troisième estomac est simple et constante. Sa muqueuse, lisse et brillante, possède de nombreuses glandes pyloriques. Un puissant sphincter le sépare de l'ampoule duodénale (Robineau, 2005).

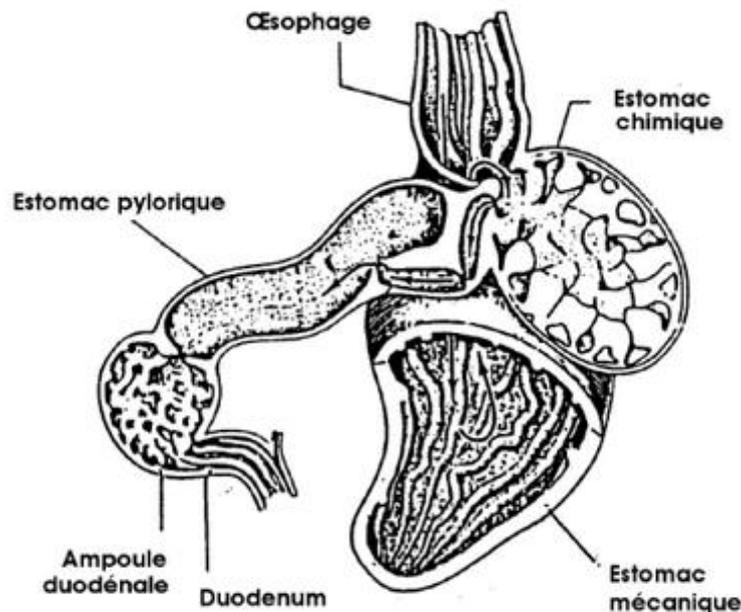


Figure 20: Estomac pluriloculé du dauphin d'après Harrison.
(d'après Robineau, 2005)

1.3. Les cétacés

1.3.1. *Le marsouin commun (Phocoena phocoena)*

Selon le Réseau National d'Echouage français, 1 430 marsouins communs se sont échoués sur les côtes françaises de la Manche de 1995 à 2014 (Van Canneyt *et al.*, 2015). Parmi ces animaux, 163 ont été autopsiés par le Docteur Jauniaux à la Faculté Vétérinaire de Liège. Les autres carcasses ont été détruites en raison de l'état avancé de putréfaction ou ont été autopsiées/prélevées en France. Parmi les 163 animaux autopsiés à Liège, il y avait 65 femelles, 95 mâles et 3 individus de sexe indéterminé. On pouvait dénombrer parmi ceux-ci 43 adultes, 115 juvéniles, 5 nouveau-nés et un fœtus provenant d'une femelle échouée gestante. Les carcasses présentaient des codes de conservation allant de 1 à 4 c'est-à-dire des animaux échoués vivants puis décédés (1), échoués morts et encore frais (2), légèrement

putréfiés (3) ou putréfiés (4). Ils ont tous été inclus pour l'étude rétrospective. A cause de la putréfaction, les animaux présentant un code de conservation 4 ne seront pas pris en compte pour l'étude pathologique des échouages mais seront conservés pour la description de la population des animaux échoués. Pour la première partie, nous avons donc 163 animaux ; le fœtus n'étant pas pris en compte comme un échouage supplémentaire pour cette étude.

a) Description de la population :

- Répartition temporelle

Les figures 21 et 22 représentent les répartitions temporelles annuelle et saisonnière pour les 163 marsouins communs inclus dans cette étude. La figure 21 donne en même temps la distribution au cours des années des échouages relevés pour la population initiale des 1 430 marsouins communs échoués sur les côtes françaises de la Manche.

Toutes les années présentent un effectif d'échouage plus ou moins important avec une tendance à l'augmentation de plus en plus importante depuis 2000. Un pic d'échouage est présent en 2013, nombre important également noté en France lorsque tous les échouages sur les côtes de la Manche sont pris en compte.

Tableau 11 : Répartition annuelle des cas d'échouages de marsouins communs sur les côtes françaises de la Manche et parmi ceux-ci les animaux autopsiés à l'ULg.

| Année | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 00 | 01 | 02 | 03 | 04 | 05 | 06 | 07 | 08 | 09 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|--|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|
| Nombre d'animaux autopsiés à l'ULg | 1 | 0 | 4 | 0 | 8 | 3 | 7 | 8 | 7 | 12 | 7 | 11 | 10 | 3 | 10 | 11 | 13 | 0 | 33 | 15 |
| Nombre d'animaux échoués en Manche française | 3 | 0 | 9 | 4 | 18 | 9 | 19 | 20 | 35 | 59 | 58 | 65 | 94 | 68 | 85 | 85 | 90 | 186 | 333 | 190 |

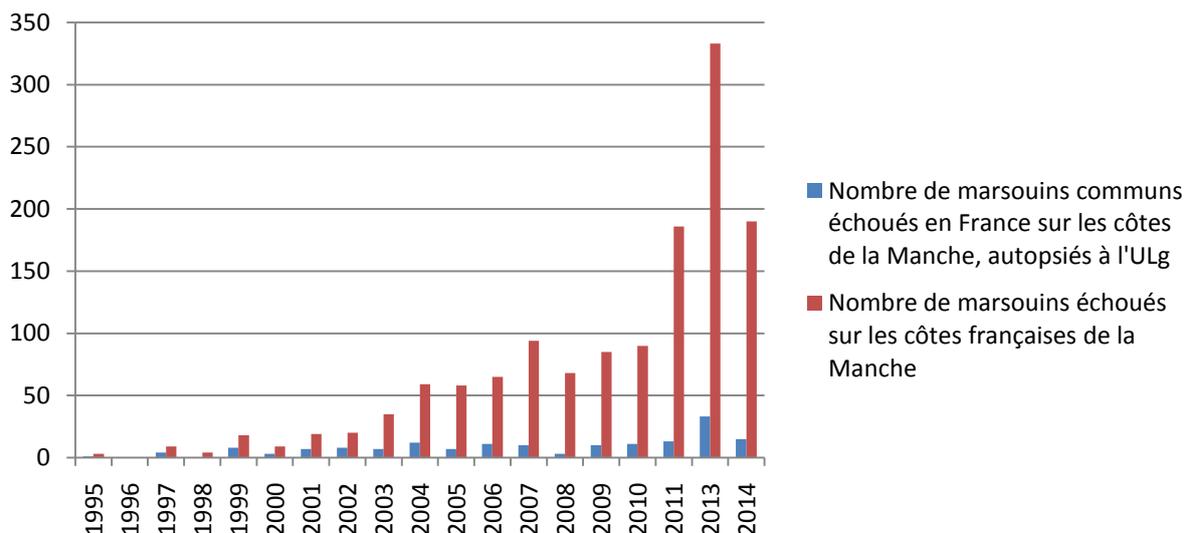


Figure 21: Répartition annuelle des cas d'échouages de marsouins communs sur les côtes françaises de la Manche et parmi ceux-ci les animaux autopsiés à l'ULg.

En ce qui concerne la répartition saisonnière des échouages sur les côtes françaises de la Manche des marsouins communs autopsiés à l'ULg, il apparaît clairement qu'il y ait une distribution saisonnière avec un pic observé fin de l'hiver, début du printemps. Ce pic est présent typiquement en Février-Mars-Avril. La densité d'échouages semble moins importante en été et en automne. Il est à noter que la répartition temporelle saisonnière n'est réalisable que pour 92 animaux, le mois d'échouage étant inconnu ou non communiqué pour les 71 autres.

Tableau 12 : Répartition saisonnière des marsouins communs échoués sur les côtes françaises de la Manche et autopsiés à l'ULg.

| Mois | Septembre | Octobre | Novembre | Décembre | Janvier | Février | Mars | Avril | Mai | Juin | Juillet | Août |
|------------------------------------|-----------|---------|----------|----------|---------|---------|------|-------|-----|------|---------|------|
| Nombre d'animaux autopsiés à l'ULg | 6 | 2 | 4 | 6 | 8 | 15 | 16 | 17 | 4 | 5 | 4 | 5 |

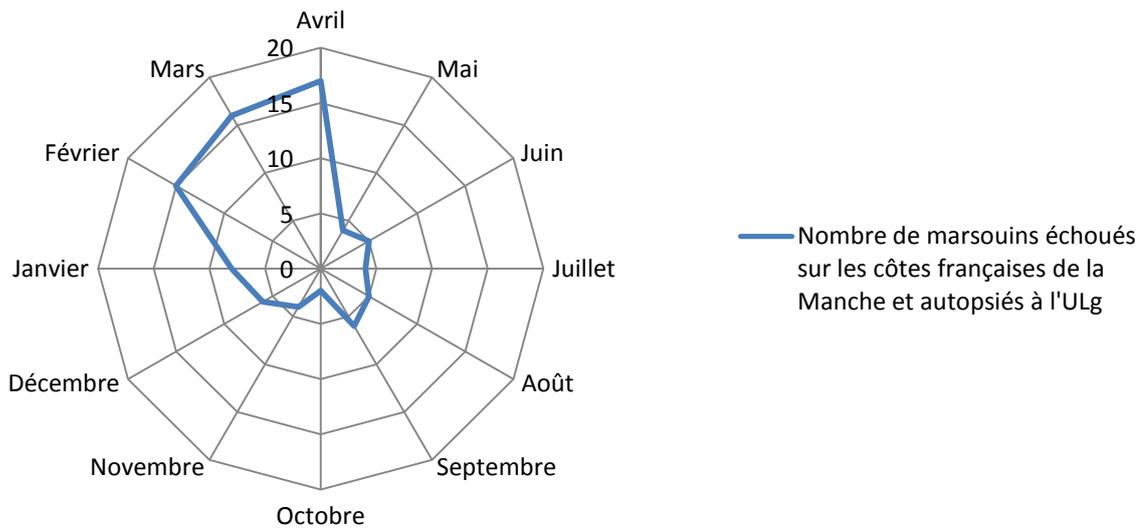


Figure 22: Répartition saisonnière des marsouins communs échoués sur les côtes françaises de la Manche et autopsiés à l'ULg.

- Répartition par sexe

La répartition de la population des 163 marsouins communs échoués étudiés ici en termes de sex-ratio est intéressante. Nous avons compté 65 femelles et 95 mâles. 3 individus présentant des codes de conservation 3 et de multiples lacérations sont de sexe indéterminé. En termes de pourcentages, cela représente 59,4% (95/160) de mâles et 40,6% (65/160) de femelles des marsouins communs échoués soit une majorité de mâles.

- Répartition par âge

L'âge exact des animaux n'est pas connu. On distingue les animaux selon qu'ils soient nouveau-nés, juvéniles ou adultes. La distinction pour ces trois catégories se fait par la mesure de la longueur totale comme expliquée plus haut. Le tableau 13 explique les correspondances entre taille et catégorie d'âge. L'examen de l'appareil reproducteur interne permet également de déterminer la maturité sexuelle du marsouin et de confirmer la classification réalisée par mesure de la longueur.

Tableau 13 : Catégories d'âge du marsouin commun en fonction de la longueur totale de l'animal.

| Catégorie d'âge | Longueur totale du corps |
|-----------------|---|
| Nouveau-né | <u>Mâle</u> : 80-100 cm <u>Femelle</u> : 80-135 cm |
| Juvenile | <u>Mâle</u> : 100-135 cm <u>Femelle</u> : 100-150 cm |
| Adulte | <u>Mâle</u> : > 135 cm <u>Femelle</u> : > 150 cm |

(d'après Jauniaux *et al.*, 2002)

Les animaux autopsiés à l'ULg comprennent 5 nouveaux nés, 115 juvéniles et 43 adultes. Aux vues de ces chiffres, les juvéniles représentent la catégorie la plus importante pour les échouages alors que les nouveaux-nés sont la sous-population la moins représentée.

39,5% (17/43) des adultes sont des mâles et 60,5% (26/43) sont des femelles. Les juvéniles mâles échoués sont au pourcentage de 65,2% (73/112) et les femelles de 34,8% (39/112) (3 individus étant de sexe indéterminé). La figure 23 présente le nombre d'animaux échoués autopsiés à l'ULg en fonction du ratio sexe/âge. Il y a donc plus de femelles adultes qui s'échouent et plus de mâles juvéniles.

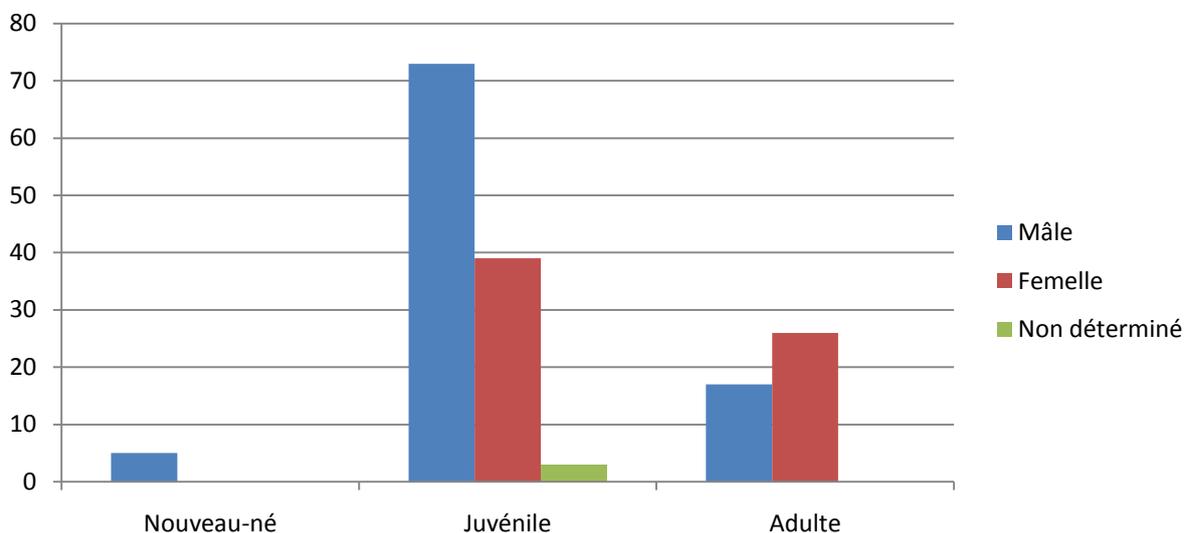


Figure 23: Répartition des marsouins communs échoués sur les côtes françaises de la Manche et autopsiés à l'ULg en termes de ratio sexe/âge.

- Données morphologiques

Pour les 163 marsouins communs analysés, des indices corporels ont été mesurés, notamment la longueur totale de l'individu, le poids corporel et l'épaisseur de lard dorsal. Ces

données sont détaillées en Annexe mais le tableau qui suit donne une moyenne pour les trois catégories d'âge : nouveau-nés, juvéniles et adultes.

Tableau 14 : Longueur totale, poids et épaisseur de lard des marsouins communs échoués sur les côtes françaises de la Manche et autopsiés à l'ULg.

| Catégorie d'âge | Nouveau-nés | Juvéniles | | | Adultes | | |
|------------------------------|-------------|-----------|---------|--------|---------|---------|--------|
| | Mâle | Mâle | Femelle | Total | Mâle | Femelle | Total |
| Longueur totale moyenne (cm) | 73 | 111,78 | 113,66 | 112,72 | 138,95 | 154,9 | 146,92 |
| Poids moyen (kg) | 6,9 | 21,63 | 21,61 | 21,62 | 36,87 | 44,46 | 40,67 |
| Épaisseur de lard moyen (mm) | 4,04 | 16,86 | 16,13 | 16,50 | 15,12 | 14,12 | 14,62 |

Chez les adultes, les femelles sont plus grandes que les mâles, quelle que soit la période considérée. Par contre chez les juvéniles, la taille est similaire. En corrélation avec la différence de taille, les femelles sont plus lourdes que les mâles chez les individus adultes. Les adultes et les juvéniles ont une épaisseur de lard similaire. Cette épaisseur est légèrement supérieure chez les mâles mais reste inférieure au 30 mm normalement observée chez un individu adulte en bon état d'embonpoint. En conclusion, les femelles adultes sont plus grandes et plus lourdes que les mâles avec une épaisseur de lard légèrement plus faible. Ces différences s'estompent chez les juvéniles.

b) Etude pathologique : causes de la mort des marsouins communs échoués :

Les causes de mortalité sont reprises dans le tableau 15, les 7 animaux ayant un code de conservation 4 ne sont pas pris en compte dans cette partie, il reste donc 156 animaux.

Tableau 15 : Listing des causes de mortalité des marsouins communs échoués de 1995 à 2014 et nombre respectif d'animaux.

| Causes de mortalité | Nombre de marsouins communs |
|--|-----------------------------|
| Capture accidentelle par les filets de pêche | 68 |
| Cause infectieuse | 63 |
| Emaciation sévère | 12 |
| Œdème pulmonaire | 5 |
| Prédation par les phoques | 1 |
| Mort-nés | 2 |
| Non déterminée | 5 |

On peut dénombrer trois causes de mortalité principales pour les marsouins communs échoués. Il y a tout d'abord les captures accidentelles par les filets de pêche qui entraîne la mort par noyade et asphyxie. Ensuite se trouvent les causes infectieuses. Enfin, l'émaciation sévère des animaux entraîne généralement la mort par œdème pulmonaire aiguë. La capture est considérée comme certaine lorsque des traces de filets ou des amputations *ante-mortem* sont présentes tandis qu'elle est suspectée en l'absence de ces lésions mais pour des animaux en bon état d'embonpoint, sans lésion particulière à l'autopsie à l'exception d'hématomes sous-cutanés, de congestion et d'œdème pulmonaire sévère (asphyxie) avec éventuellement un contenu alimentaire récent dans l'estomac.

- La capture accidentelle par les filets de pêche

La capture accidentelle par les filets de pêche est responsable de 68 cas d'échouages autopsiés à l'ULg de 1995 à 2014, échoués sur les côtes françaises de la Manche. Dans un tel cas, la mort est consécutive à l'asphyxie. On s'aperçoit qu'il y a de plus en plus de cas de capture depuis 2003 mais sans réelle tendance pour notre échantillonnage (fig.24). En ce qui concerne la répartition saisonnière, on note un pic significatif en Mars (fig.25).

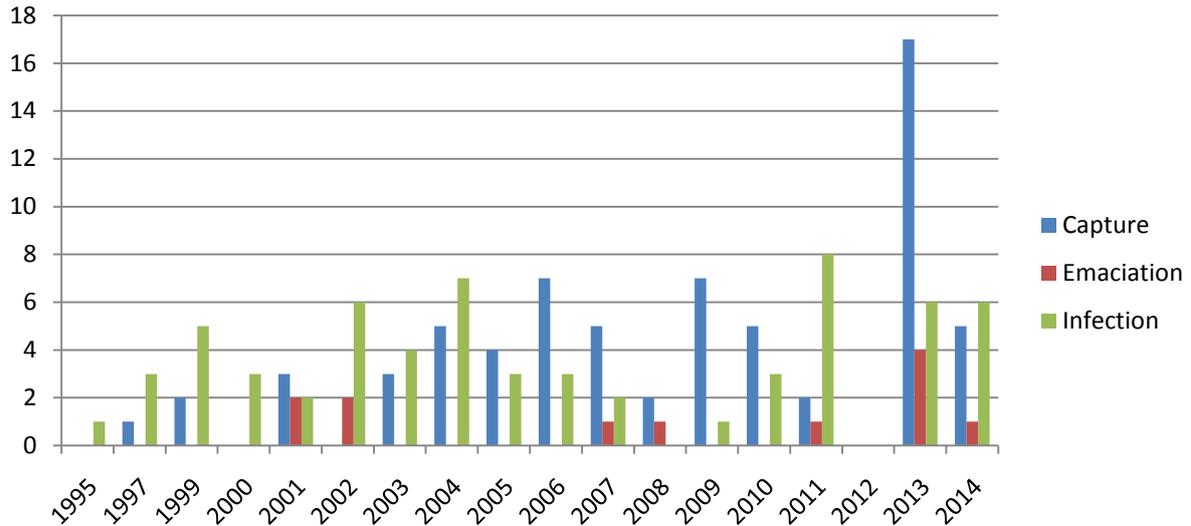


Figure 24: Répartition annuelle des 3 principales causes de mortalité des marsouins échoués sur les côtes françaises de la Manche et autopsiés à l'ULg.

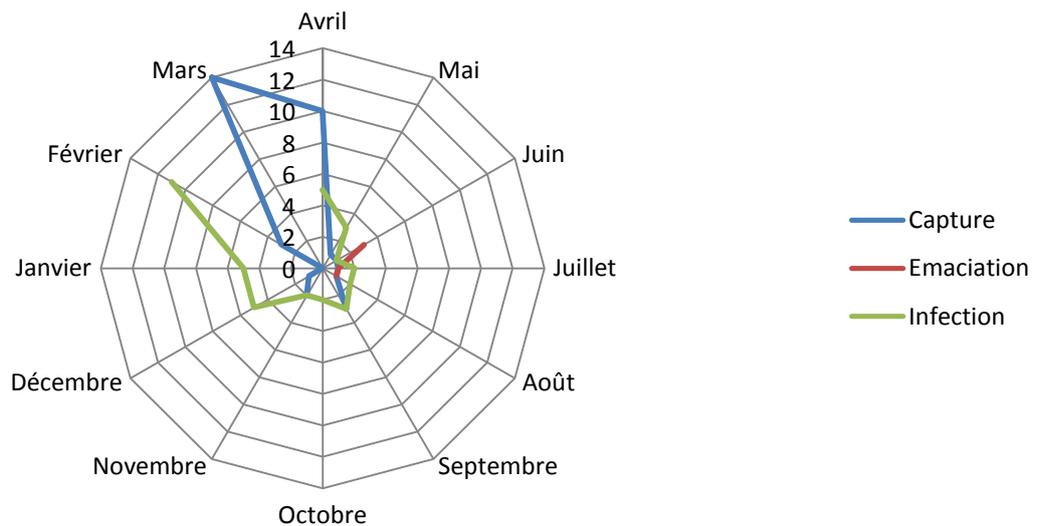


Figure 25: Répartition saisonnière des 3 principales causes de mortalité des marsouins échoués sur les côtes françaises de la Manche et autopsiés à l'ULg.
Répartition sur toutes les années

Données biologiques:

Parmi les 68 carcasses de marsouins communs décédés par capture accidentelle, 67,7% (44/65) sont des mâles et 32,3% (21/65) sont des femelles, trois étant de sexe inconnu (fig.26). Ainsi, deux fois plus de mâles que de femelles se font capturer accidentellement par les filets de pêche. Les juvéniles représentent la très large majorité de la population capturée avec un pourcentage de 88,2% (60/68) des individus (fig.27).

Les marsouins communs capturés ont une taille moyenne de 117,2 cm, un poids moyen de 26,2 kg et une épaisseur de lard moyenne de 20,9 mm.

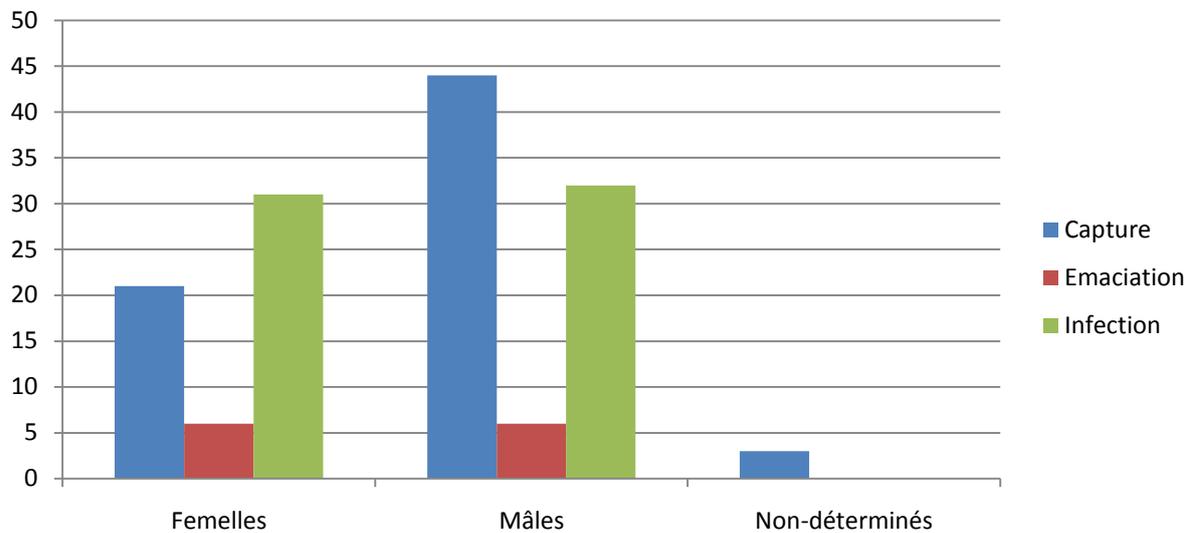


Figure 26: Distribution des animaux échoués suivant la cause de la mort et leur sexe.

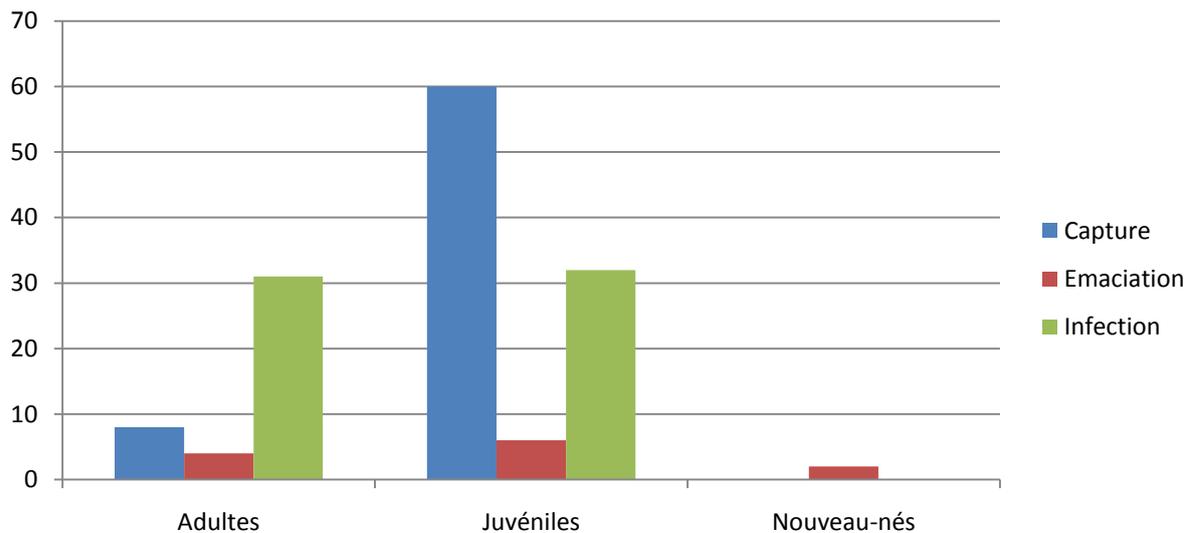


Figure 27: Distribution des animaux échoués suivant la cause de la mort et leur catégorie d'âge.

Données pathologiques:

Dans le cas de capture accidentelle par les filets de pêche, les animaux présentent deux catégories de lésions : celles en rapport avec la capture et celles indépendantes de celle-ci. Dans la première catégorie, on peut relever des lésions faisant suspecter une capture de type lacérations cutanées qui sont des empreintes des filets de pêche sur le corps de l'animal, un œdème pulmonaire, des hématomes sous-cutanés signalant que l'animal s'est débattu, des pétéchies dans le lard et de l'hyphéma. Chez certains individus, des éventrations ou des

amputations *post-mortem* au couteau réalisées par les pêcheurs afin de libérer leurs filets ont été observées. Enfin se sont généralement des animaux en bon état d'embonpoint.

L'hyphéma, les pétéchies, la congestion et l'œdème pulmonaire sont la conséquence de l'hypoxie associée au processus d'asphyxie. Néanmoins, les individus peuvent présenter des lésions antérieures à la capture. Ainsi, un pourcentage non nul des animaux autopsiés présente une émaciation sévère, de la parasitose ou encore de la pneumonie. De même, un estomac plein peut faire suspecter une capture accidentelle, qui est un évènement brutal. Ici, du contenu stomacal était présent dans 51 cas sur 64 animaux mais 13 individus présentaient un estomac vide (pour 4 individus, le contenu stomacal n'a pas été rapporté) (fig.28 et 29).

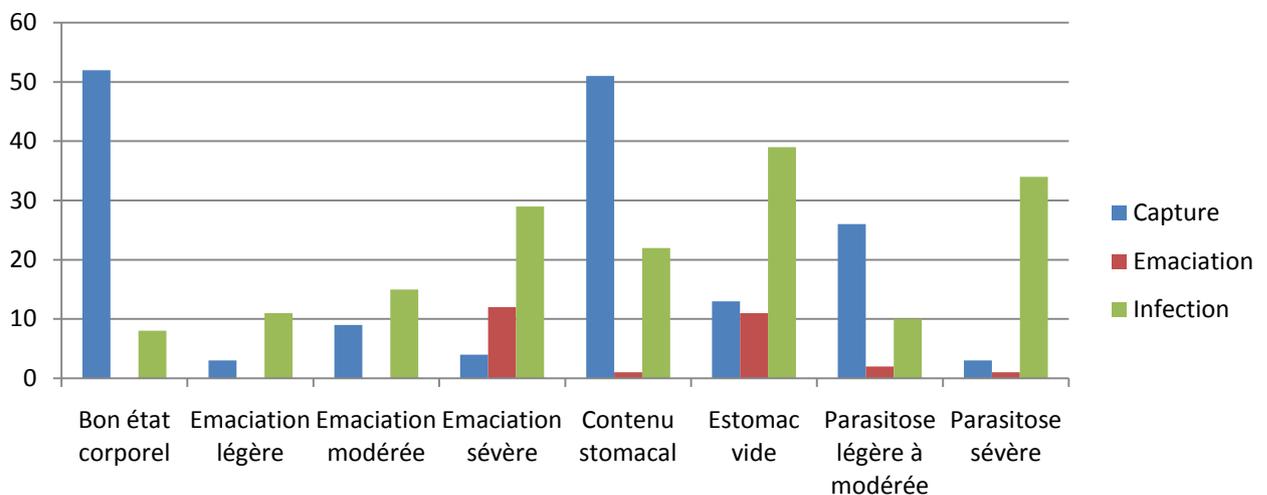


Figure 28: Lésions observées à l'autopsie suivant les trois causes de mortalité principales des marsouins communs échoués sur les côtes françaises de la Manche et autopsiés à l'ULg (1).

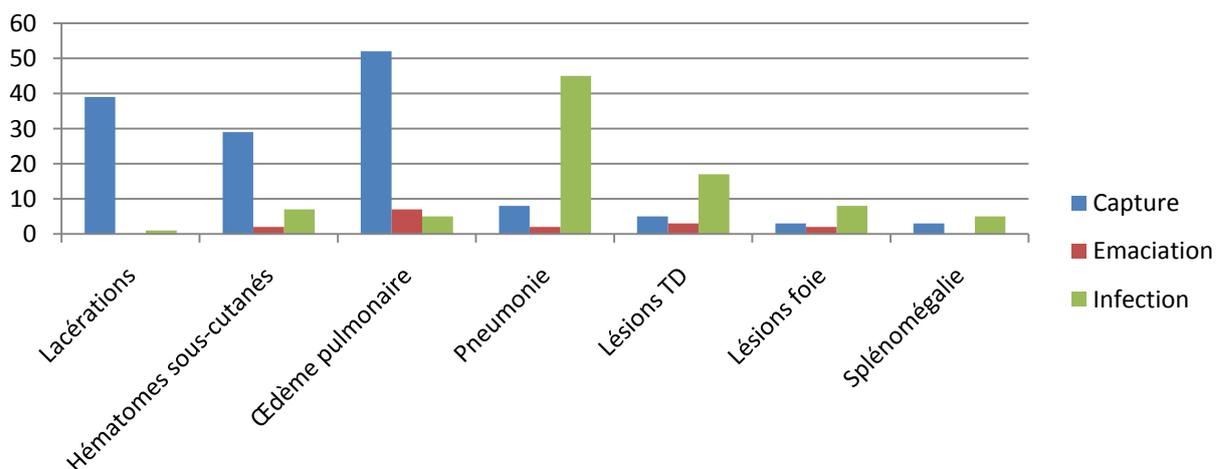


Figure 29: Lésions observées à l'autopsie suivant les trois causes de mortalité principales des marsouins communs échoués sur les côtes françaises de la Manche et autopsiés à l'ULg (2).

- Les causes infectieuses

Pour 63 cas, la mort des marsouins communs échoués était consécutive à un processus infectieux lié à des parasitoses sévères, des bronchopneumonies souvent purulentes et/ou hémorragiques avec des cas de thrombo-embolies pulmonaires. L'émaciation plus ou moins sévère des animaux est le témoin de la maladie. On peut aussi noter que dans 17 cas sur 63, des lésions du tube digestif principalement des stomatites ulcérales, des gastrites et des entérites étaient présentes. A l'autopsie, un individu présentait une péritonite aiguë. On peut également recenser pour six animaux la présence d'abcès musculaires, un cas de polyarthrite et enfin un cas de pleurésie aiguë. Pour notre échantillonnage, nous n'observons pas de tendance dans l'évolution annuelle de processus infectieux comme cause de mortalité mais seulement, plus ou moins d'individus suivant les années (fig.24). Cependant, nous observons que la majorité des cas d'infection surviennent en hiver avec un pic en Février (fig.25).

Données biologiques:

Parmi les 63 marsouins communs autopsiés, 50,8% (32/63) sont des mâles et 49,2% (31/63) sont des femelles (fig.26). Il y a donc une parité entre les deux sexes. Pour l'importance relative des différentes catégories d'âge des marsouins communs échoués morts suite à un processus infectieux, 50,8% (32/63) sont des juvéniles et 49,2% (31/63) sont des adultes (fig.27). On peut également noter un équilibre entre les juvéniles et les adultes. Les individus ont une taille moyenne de 130,6 cm, un poids moyen de 30,1 kg et une épaisseur de lard moyenne de 12,1 mm.

Données pathologiques:

Dans le cas de parasitose sévère, les marsouins présentaient des infestations du tractus respiratoire, des vaisseaux sanguins pulmonaires, du ventricule droit et de l'oreille moyenne. La parasitose vasculaire a été responsable dans certains cas de thrombi.

55 individus parmi les 63 présentaient une émaciation sévère, 4 une émaciation légère à intermédiaire, les 4 derniers étant en bon état d'embonpoint. 22 animaux avaient un estomac contenant un bolus alimentaire ou des otolithes tandis que les 39 autres avaient un estomac totalement vide (fig.28 et 29). Un otolithe est une concrétion minérale retrouvée dans l'appareil vestibulaire de l'oreille interne des poissons qui peut rester 3-4 jours présente dans l'estomac des marsouins.

La lésion la plus fréquemment associée au processus infectieux était une bronchopneumonie (71,4% (45/63)) parfois purulente ou granulomateuse associée la plupart du temps à la présence de nématodes pulmonaires et d'une mousse plus ou moins abondante dans les voies respiratoires. Du pus et de la fibrine pouvaient être aussi présents dans les voies respiratoires. La pneumonie était la plupart du temps aiguë signalant des complications bactériennes responsables de la mort de l'animal par asphyxie. L'émaciation est la conséquence à moyen terme d'un amaigrissement consécutif aux lésions parasitaires et à l'affaiblissement de l'animal provoquant des difficultés pour l'activité de chasse.

- L'émaciation

L'émaciation ou cachexie est un état pathologique de maigreur extrême. De 1995 à 2014, pour les marsouins communs échoués le long des côtes françaises de la Manche et autopsiés à l'ULg, l'émaciation sévère a été responsable de 12 morts. Dans un tel tableau clinique, l'hypoprotéïnémie entraîne une diminution de la pression oncotique dans les vaisseaux sanguins, provoquant un œdème pulmonaire entraînant la mort par asphyxie. On ne peut pas conclure en une évolution annuelle des cas d'émaciation puisque nous ne comptons que 12 animaux pour une période de 19 ans (fig.24). La plupart des cas d'émaciation sévère surviennent en été (fig.25).

Données biologiques:

Parmi les 12 individus, 50% (6/12) étaient des femelles et 50% (6/12) sont des mâles (fig.26). En ce qui concerne les différentes catégories d'âge, l'émaciation est responsable de deux morts sur trois chez les nouveaux-nés en bon état de conservation, l'autre étant mort-né. Les juvéniles constituent 6 individus parmi les 12 et les adultes 4 (fig.27). Les individus présentaient une longueur totale moyenne de 115,8 cm, un poids corporel moyen de 21,9 kg et une épaisseur de lard moyenne de 6,0 mm, dernier chiffre très faible témoin de l'émaciation extrême.

Données pathologiques:

L'émaciation est souvent rapportée chez les marsouins échoués morts d'un processus infectieux. Dans cette catégorie avec 12 individus se retrouvent dès lors seulement les animaux présentant une diminution significative de l'épaisseur de lard sous-cutané avec amyotrophie sévère et disparition de la graisse viscérale, en l'absence de lésions infectieuses

ou traumatiques. De plus, parmi les 12 individus, 11 avaient un estomac vide et le dernier présentait seulement quelques otolithes.

En ce qui concerne les lésions visibles à l'autopsie, on observe dans la majorité des cas une congestion généralisée des poumons accompagnée d'un œdème pulmonaire et de mousse blanche à hémorragique dans les voies respiratoires (fig.28 et 29). Cette mousse est la conséquence de l'œdème pulmonaire.

- Autres causes de mortalité

La mort a été associée à un œdème pulmonaire d'origine indéterminée dans cinq cas. En effet, les animaux ne présentaient ni d'évidence de capture, ni de lésions inflammatoires sévères ni d'émaciation marquée. Un marsouin présentait des preuves de l'attaque par un phoque. Deux marsouins échoués étaient des mort-nés. Enfin, la cause de la mort n'a pu être identifiée dans les cinq derniers cas.

1.3.2. *Dauphin commun (Delphinus delphis)*

Un dauphin commun à bec court s'est échoué le 17 Janvier 2013 à Camiers dans le Pas de Calais. Il s'agissait d'un mâle adulte de 175 cm, de 53 kg et présentant une épaisseur de lard de 12 mm.

L'examen *post-mortem* a montré une carcasse présentant une décoloration généralisée évoquant une anémie, et une émaciation sévère. A l'examen interne, l'animal présentait des pétéchies dans le lard sous-cutané, une splénomégalie, des ulcères dans l'estomac glandulaire ainsi que des parasites et des pétéchies sur le thymus. La sphère respiratoire présentait d'importantes lésions dont une congestion et un œdème pulmonaires sévères généralisés associés à la présence de mousse blanchâtre dans les voies respiratoires. Les poumons présentaient également une pneumonie aiguë à chronique et un emphysème. Enfin, l'examen de l'appareil génital dévoilait un micropénis (3 cm, normalement supérieure à 20 cm) et une hypoplasie des testicules (6x1,5 cm).

Très peu de contenu alimentaire était présent dans l'estomac, seulement quelques otolithes. La cause de la mort est très probablement d'origine infectieuse.

1.3.3. *Lagénorhynque à bec blanc (Lagenorhynchus albirostris)*

Un dauphin à bec blanc s'est échoué le 22 Novembre 2015 sur une plage à proximité de Calais en France. C'était un individu femelle adulte, mesurant 262 cm et pesant environ 250 kg. L'épaisseur de lard moyenne de cet animal était de 17 mm, révélant une émaciation intermédiaire. Ce dauphin s'est échoué vivant, puis est décédé sur la plage, ce qui représente un code de conservation 1, animal très frais. A l'examen externe de l'animal, on pouvait noter de multiples érosions péri-mortem sur tout le corps, témoins que le dauphin s'est débattu sur la plage lors de son échouage. Trois ulcères cutanés de 3-4 cm de long environ étaient présents à la base de la nageoire dorsale. A l'ouverture de la cavité buccale, les bords libres de la base de la langue présentaient des ulcères chroniques de 1 cm de diamètre. Sur le plafond de l'arrière bouche et surplombant la base de la langue, on a pu noter une masse de tissu mou d'origine inconnue de 10 cm de long, 5 cm de large et pendante de 3 cm. Lors de l'autopsie, toute la carcasse présentait un œdème sous-cutané ou encore anasarque. La graisse et les aponévroses apparaissaient jaunes, signe d'ictère. Les nœuds lymphatiques préscapulaires étaient hypertrophiés et réactionnels. En ce qui concerne l'examen de la cavité abdominale, on pouvait noter une splénomégalie (rate de 10 cm), un aspect zébré du foie sur sa face pariétale et des adhérences fibreuses sur la face pariétale. Le foie semblait hypertrophié mais cela pourrait juste être un artéfact de congélation, l'animal n'étant pas totalement décongelé lors de l'autopsie. Les estomacs étaient globalement vides à l'exception de quelques rares otolithes et cristallins de poissons. Une très légère parasitose était présente dans les estomacs mécanique et sécrétant. L'estomac mécanique présentait une gastrite chronique diffuse hyperplasiant avec des spots hémorragiques dans la sous-muqueuse. Les intestins ne présentaient aucun contenu. La vessie était vide. Pour l'appareil reproducteur, du sable était présent dans le vagin. Le bouchon muqueux cervical était présent. L'ovaire gauche révélait 12 *corpus albicans* et de manière surprenante, le droit présentait 3 cicatrices. Enfin, pour la cavité thoracique, une œsophagite pseudomembraneuse et une congestion péri-laryngée étaient notables. Les poumons présentaient une congestion et un œdème généralisé associés à une abondante mousse blanche dans les voies respiratoires.

Les lésions de la cavité buccale et de l'œsophage expliquent très certainement l'arrêt de la prise alimentaire par cet animal et l'émaciation qui s'en suit. La cause de l'échouage n'est pas identifiable à ce stade. Pour émettre des hypothèses, il faut attendre les observations histologiques, qui n'ont pas encore été réalisées.

1.3.4. *Globicéphales noirs (Globicephala melas)*

Trois globicéphales parmi les 7 échoués ont été collectés le mardi 3 novembre à 8h00 à Calais et transportés directement à la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège. Ils sont arrivés à 13h00 à la Faculté et les autopsies ont directement commencé.

Le premier globicéphale était une femelle adulte d'environ 1 200 kg, en bon état nutritionnel. Les épaisseurs de lard sous-cutané mesurées étaient de 48 mm en dorsal, 43 mm en latéral et 42 mm en ventral. Le cadavre était positionné sur la face gauche et l'ouverture a été réalisée sur la face droite.

A l'examen externe, aucune lésion n'était présente. Lors du retrait du lard et de la peau, une dizaine de kystes de 8 à 10 mm de diamètre à contenu blanc ont été repérés en région abdominale caudale. L'examen interne de l'animal a révélé d'autres informations. Le péritoine en région périgénitale présentait une dizaine de kystes parasitaires de 20 à 30 mm de diamètre. Une masse surélevée de 10cmx6cm en surface du lobe droit du foie était présente. L'ouverture de cette masse a révélé une cavité remplie de gaz. Quelques kystes parasitaires de 20 à 30 mm de diamètre étaient présents dans le mésentère dans la partie distale de l'intestin. Il n'y avait quasiment pas de contenu digestif dans l'intestin et de rares nématodes libres dans la lumière intestinale ont été découverts. L'inspection de l'estomac a mis en avant la présence de plusieurs nodules faisant légèrement protusion dans la lumière gastrique. A l'incision, la consistance était légèrement plus dure et le contenu était noir. De plus, la muqueuse gastrique était hyperplasiée. Le contenu stomacal était composé d'environ 5 litres de liquide. Le liquide a été tamisé et il n'y avait aucun contenu alimentaire récent ou ancien (otolithes, becs de céphalopodes) dans l'estomac. L'examen de la muqueuse de l'estomac a permis de mettre en évidence une légère parasitose par des nématodes. La vessie contenait une urine surcolorée, foncée à rougeâtre avec présence de flocons hémorragiques. La muqueuse et la paroi demeuraient macroscopiquement normales. Un bouchon muqueux obstruait le col utérin signalant que la femelle n'était pas en période de reproduction. Enfin, l'ovaire gauche présentait deux structures type *corpus albicans* et l'ovaire droit quelques follicules. Cette donnée est étrange puisque chez les odontocètes, seul l'ovaire gauche est normalement fonctionnel. A l'ouverture du thorax, les poumons présentaient un aspect uniformément congestif (rouge) et oedematié (humide). Une abondante mousse blanche légèrement hémorragique était présente dans l'ensemble des voies respiratoires. Un kyste de 8 à 10 mm de diamètre à contenu blanc était présent dans le médiastin, en surface de la bronche droite,

caudalement à la bifurcation de la trachée. On pouvait noter des zones décolorées en surface du myocarde évoquant les « stranding band necrosis » déjà décrite lors d'échouage d'animaux vivants de grand gabarit (Jauniaux *et al.*, 2002). Au retrait de la tête, une congestion sévère était observée autour des méninges.

Le second globicéphale était une femelle adulte d'environ, en bon état nutritionnel. Les mesures de lard sous-cutané ont donné 44 mm en dorsal, 40 mm en latéral et 44 mm en ventral. Le cadavre est positionné sur la face gauche et l'ouverture a été réalisée sur la face droite.

A l'examen externe, un ulcère chronique de 10 cm de diamètre à 20 cm au-dessus de la nageoire pectorale droite a été observé. La surface était blanche, irrégulière formée d'un épithélium hyperplasié. La femelle était allaitante. Le muscle sous-scapulaire avait un aspect hémorragique et le ganglion préscapulaire était congestif et hypertrophié. La graisse sous-cutanée présentait une dizaine de kystes de 8 à 10 mm de diamètre à contenu blanc.

En ce qui concerne l'examen de l'abdomen, le péritoine pariétal était parsemé de plusieurs kystes parasitaires de 8 à 10 mm de diamètre à contenu blanc, en région caudale, sous la vessie. La muqueuse du second estomac présentait plusieurs ulcères chroniques de 0,5 à 1,5 cm de diamètre. 4-5 nodules de type parasitaire faisaient protusion dans la lumière gastrique du troisième estomac. Environ 5 litres de contenu liquide était présent dans les estomacs. Le liquide a été tamisé et aucun otolithe ou bec de céphalopode n'ont été mis en évidence. A l'incision, la consistance était légèrement plus dure et le contenu est noir. De plus, la muqueuse gastrique était hyperplasiée. La corne utérine gauche était hypertrophiée avec des vaisseaux sanguins très visibles. L'ovaire gauche présentait à sa surface une structure type corps jaune de 2 cm de diamètre et un kyste.

L'examen thoracique a révélé un aspect uniformément congestif (rouge) et oedématié (humide) des deux poumons. Une abondante mousse blanche légèrement hémorragique était présente dans l'ensemble des voies respiratoires. Les ganglions pulmonaires étaient de coloration hétérogène, prenant une disposition en mosaïque noire.

Enfin, le troisième globicéphale transporté à la Faculté Vétérinaire de Liège était un mâle juvénile d'environ 1 200 kg en bon état nutritionnel. Les épaisseurs de lard sous-cutané étaient de 46 mm en dorsal, 34 mm en latéral et 38 mm en ventral. Le cadavre est positionné sur la face droite et l'ouverture a donc été réalisée sur la face gauche. L'examen externe de

l'animal n'a révélé aucune anomalie. A l'ouverture, le muscle oblique externe présentait deux nématodes au niveau de son aponévrose. La graisse sous-cutanée de la région abdominale caudale contenait une dizaine de kystes de 8 à 10 mm de diamètre à contenu blanc. L'autopsie de l'abdomen a révélé une dizaine de kystes parasitaires de 20 à 30 mm de diamètre autour de la sphère uro-génitale sur le péritoine pariétal. L'intestin ne contenait quasiment aucun contenu digestif. Le troisième estomac présentait une dizaine de nodules parasitaires dans la paroi stomacale, faisant protusion dans la lumière. Environ 5 litres de contenu liquide était présent dans les estomacs. Le liquide a été tamisé et il y avait présence de quelques otolithes et d'un bec de céphalopode. Les testicules mesuraient 13,3 cm de longueur sur 5,5 cm de largeur confirmant la juvénilité de l'individu.

A l'ouverture du thorax, l'aspect uniformément rouge et humide des poumons révélait une congestion et un œdème pulmonaires sévères. Une abondante mousse blanche légèrement hémorragique était présente dans l'ensemble des voies respiratoires.

Au retrait de la tête, une congestion sévère a été observée autour des méninges.

Pour ces trois individus, la conclusion de l'autopsie a été la même, à savoir que l'examen macroscopique n'a pas permis de mettre en évidence de processus pathologique moyen ou sévère pouvant expliquer l'échouage de ces individus. Les observations pulmonaires (congestion et œdème sévères) sont compatibles avec l'échouage d'un cétacé vivant et l'agonie finale.

1.4. Les Pinnipèdes

1.4.1. *Le phoque commun ou veau-marin (Phoca vitulina)*

De 1995 à 2014, 637 phoques veaux-marins se sont échoués sur les côtes françaises de la Manche (Van Canneyt *et al.*, 2015). Parmi ces individus, 49 ont été autopsiés à l'ULg. Le suivi des animaux étant moins performant que pour les cétacés, de nombreux pinnipèdes ont été autopsiés au service de pathologie de la Faculté Vétérinaire de Liège sans que le pays d'échouage n'ait été noté sur le rapport. Le lieu d'échouage français est donc seulement avéré pour ces 49 animaux que nous intégrons à notre étude. Parmi ces individus certains se sont échoués morts mais d'autres se sont échoués vivants et ont été récupérés par des organismes spécialisés où ils n'ont pas survécu. La distribution des 49 phoques communs est de 20

femelles, 28 mâles et un de sexe indéterminé à cause de la putréfaction avancée de l'animal ; 39 juvéniles et 10 adultes.

a) Description de la population :

- Répartition temporelle

Les figures 30 et 31 représentent les répartitions temporelles annuelle et saisonnière pour les 49 phoques veaux-marins inclus dans cette étude. La figure 30 donne en même temps la distribution au cours des années des échouages pour la population initiale des 637 phoques communs échoués sur les côtes françaises de la Manche.

Toutes les années présentent un effectif d'échouage plus ou moins important avec une tendance à l'augmentation linéaire depuis les années 90s. Une augmentation de plus de 50% des échouages a été notée sur les côtes françaises de la Manche à la saison 2012-2013, ce qui s'est confirmée à la saison 2013-2014 (Van Canneyt *et al.*, 2015). Notre échantillonnage ne reflète pas cette augmentation ces deux dernières années. Le Réseau National d'Echouage français enregistre les périodes d'échouage des pinnipèdes du 1^{er} Novembre au 31 Octobre. Pour notre étude, nous les répartissons selon les années civiles puisque nous n'avons pas les mois d'échouages pour tous les individus.

Tableau 16 : Répartition annuelle des cas d'échouages de phoques communs sur les côtes françaises de la Manche et parmi ceux-ci les animaux autopsiés à l'ULg.

| Année | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 00 | 01 | 02 | 03 | 04 | 05 | 06 | 07 | 08 | 09 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
|--|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Nombre d'animaux autopsiés à l'ULg | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 3 | 5 | 5 | 1 | 4 | 1 | 3 | 1 | 0 | 1 | 10 | 2 | 5 | 0 | 5 | 1 |
| Année | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 00 | 01 | 02 | 03 | 04 | 05 | 06 | 07 | 08 | 09 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
| | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 00 | 01 | 02 | 03 | 04 | 05 | 06 | 07 | 08 | 09 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
| Nombre d'animaux échoués en Manche française | 6 | 11 | 15 | 19 | 19 | 18 | 21 | 21 | 24 | 28 | 30 | 29 | 38 | 39 | 37 | 48 | 33 | 49 | 74 | 78 | NC |

NC : Non Communiqué

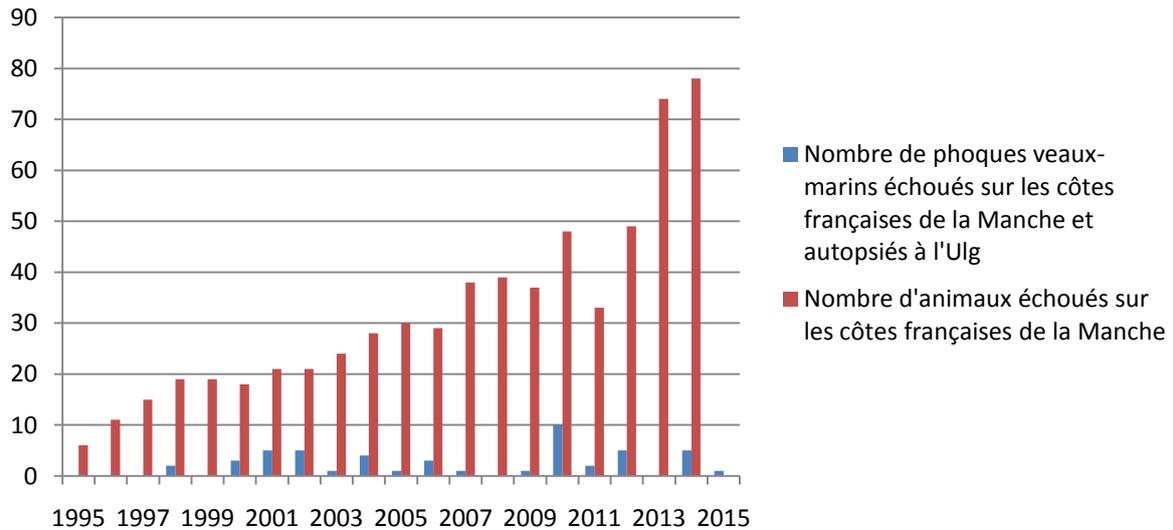


Figure 30: Répartition annuelle des cas d'échouages de phoques communs sur les côtes françaises de la Manche et parmi ceux-ci les animaux autopsiés à l'ULg.

En ce qui concerne la répartition saisonnière des échouages sur les côtes françaises de la Manche des phoques communs autopsiés à l'ULg, il apparaît qu'il y ait une distribution saisonnière des échouages avec un pic en Août. Cependant, la répartition temporelle saisonnière n'est réalisable que pour 23 animaux, le mois d'échouage étant inconnu ou non communiqué pour les 26 autres. Cela constitue donc un faible échantillon pour mettre en évidence une tendance. Le Réseau National d'Echouage français note une saisonnalité marquée des échouages de phoques communs avec un pic d'abondance en période estivale (Van Canneyt *et al.*, 2015).

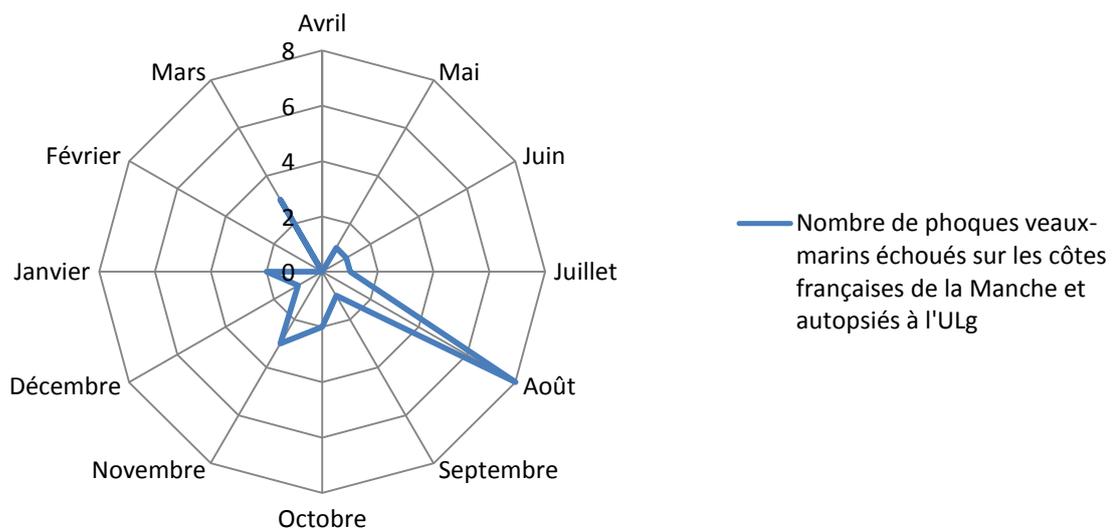


Figure 31: Répartition saisonnière des phoques communs échoués sur les côtes françaises de la Manche et autopsiés à l'ULg.

Répartition sur les années de 1995 à 2014.

- Répartition par sexe

La répartition de la population des 49 phoques veaux-marins échoués étudiés ici en termes de sexe-ratio est de 20 femelles, 28 mâles et un individu de sexe indéterminé. En terme de pourcentages, cela représente 58,3% (28/48) de mâles et 41,7% (20/48) de femelles des phoques communs échoués soit une majorité de mâles.

- Répartition par âge

L'âge exact des animaux n'est pas connu. On distingue les animaux selon qu'ils soient juvéniles ou adultes. Les animaux autopsiés à l'ULg comprennent 39 juvéniles et 10 adultes. Aux vues de ces chiffres, les juvéniles représentent la catégorie la plus importante pour les échouages. Parmi les adultes, 70% (7/10) sont des mâles et 30% (3/10) sont des femelles. 55.3% (21/38) des juvéniles sont des mâles et 44.7% (17/38) des femelles (1 individu est de sexe indéterminé). La figure 32 présente le nombre d'animaux échoués autopsiés à l'ULg en fonction du ratio sexe/âge.

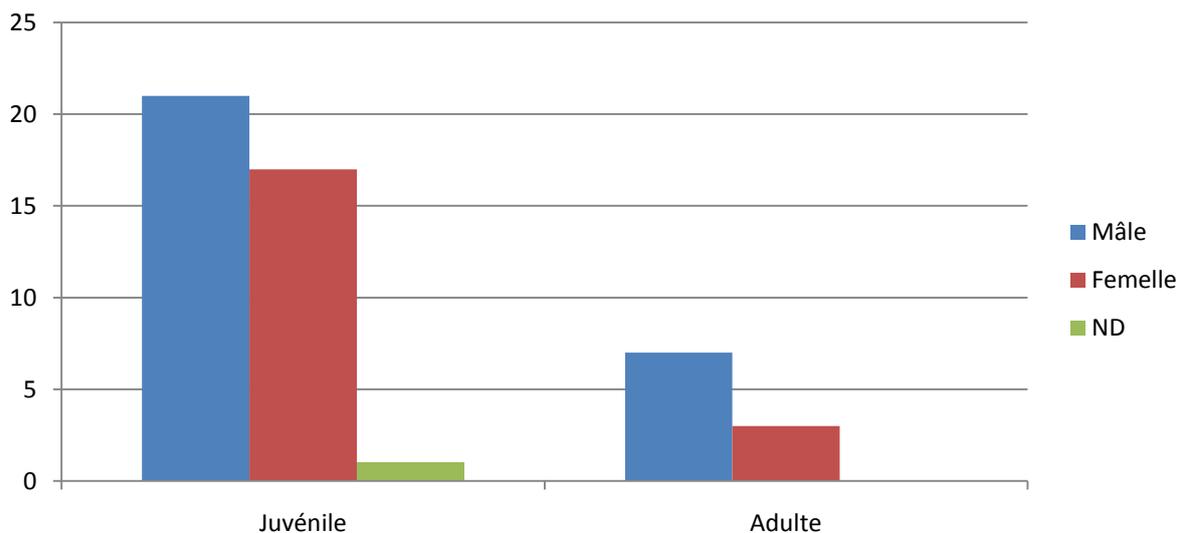


Figure 32: Répartition des phoques communs échantillonnés sur les côtes françaises de la Manche et autopsiés à l'ULg en termes de ratio sexe/âge.

- Données morphologiques

Pour les 49 phoques veaux-marins analysés, des indices corporels ont été mesurés, notamment la longueur totale de l'individu, le poids corporel et l'épaisseur de lard dorsal. Ces données sont détaillées en Annexe. Le tableau 17 qui suit donne une moyenne pour les deux catégories d'âge : juvéniles et adultes.

Tableau 17: Longueur, poids et épaisseur de lard des phoques communs échantillonnés sur les côtes françaises de la Manche et autopsiés à l'ULg.

| Catégorie d'âge | Juvéniles | | | Adultes | | |
|------------------------------|-----------|---------|--------|---------|---------|--------|
| | Mâle | Femelle | Total | Mâle | Femelle | Total |
| Longueur totale moyenne (cm) | 105.85 | 95.03 | 100.44 | 149.57 | 145.00 | 146,84 |
| Poids moyen (kg) | 18.8 | 17.6 | 18.2 | 56.9 | 44.5 | 49.6 |
| Epaisseur de lard moyen (mm) | 11.53 | 14.73 | 13.13 | 13.86 | 17.67 | 16.08 |

Les mâles sont plus grands et plus lourds que les femelles que cela soit chez les juvéniles que chez les adultes. La différence de poids entre mâles et femelles est moins grande chez les juvéniles. Les juvéniles ont une épaisseur de lard en moyenne de 3 mm plus fine que les adultes. Par contre, chez les juvéniles et chez les adultes, les femelles ont une épaisseur de lard en moyenne 3 mm au-dessus de celle des mâles. Cependant, ces moyennes d'épaisseur de

lard dorsal sont inférieures à celles que l'on devrait mesurer chez des animaux en bon état corporel.

b) Etude pathologique : causes de la mort des phoques veaux-marins échoués :

Les causes de mortalité sont reprises dans le tableau 18, les 2 animaux avec un code de conservation 4 ne sont pas pris en compte, il reste donc 47 animaux. Le code de conservation n'avait pas été inscrit pour 7 autres individus mais les observations lésionnelles et les conclusions de l'autopsie nous indiquent qu'ils présentaient sûrement un code de conservation inférieur ou égal à 3.

Tableau 18: Listing des causes de mortalité des phoques veaux-marins échoués et nombre respectif d'animaux.

| Causes de mortalité | Nombre de marsouins communs |
|--|-----------------------------|
| Capture accidentelle par les filets de pêche | 13 |
| Cause infectieuse | 25 |
| Emaciation sévère | 7 |
| Œdème pulmonaire d'origine indéterminée | 1 |
| Asphyxie | 1 |

Tout comme pour les marsouins communs, les trois causes d'échouage principales pour les phoques veaux-marins sont : les captures accidentelles par les filets de pêche qui entraîne la mort par noyade et asphyxie, les causes infectieuses et enfin l'émaciation sévère des animaux entraînant souvent la mort par œdème pulmonaire aiguë. Lors de capture accidentelle par les filets de pêche, les lacérations cutanées sont rarement visibles chez les phoques à cause de leur épaisse fourrure. Ainsi, la majorité des animaux décédés d'asphyxie suite à la capture par les filets de pêche présentaient un bon état d'embonpoint, un œdème pulmonaire aigu et des hématomes sous-cutanés. Deux animaux sont morts d'une autre cause que les trois étiologies les plus souvent rencontrées. Un phoque veau-marin est mort suite à un œdème pulmonaire aigu d'origine indéterminé, c'est-à-dire que l'animal ne présentait ni émaciation ni signe de capture accidentelle. Enfin, le dernier est décédé d'asphyxie induite par une sole présente dans l'œsophage dont la tête était coincée dans les choanes de l'animal.

Pour la suite, nous allons nous concentrer exclusivement sur les trois causes de mortalité les plus souvent rencontrées.

- La capture accidentelle par les filets de pêche

La capture accidentelle par les filets de pêche est responsable de 13 cas d'échouages autopsiés à l'ULg de 1995 à 2015, échoués sur les côtes françaises de la Manche. Rappelons que le faible nombre d'individus est dû au fait que l'origine des animaux autopsiés n'a pas été noté systématiquement. Dans un tel cas, la mort est consécutive à l'asphyxie. On s'aperçoit qu'il y a de plus en plus de cas de capture depuis 2010, dépassant ainsi les 50% de mortalité pour les animaux échoués sur l'année mais ceci est biaisé par le faible nombre d'animaux (fig.33). En ce qui concerne la répartition saisonnière, nous possédons le mois d'échouage pour seulement trois individus donc nous ne pouvons émettre aucune observation (fig.34).

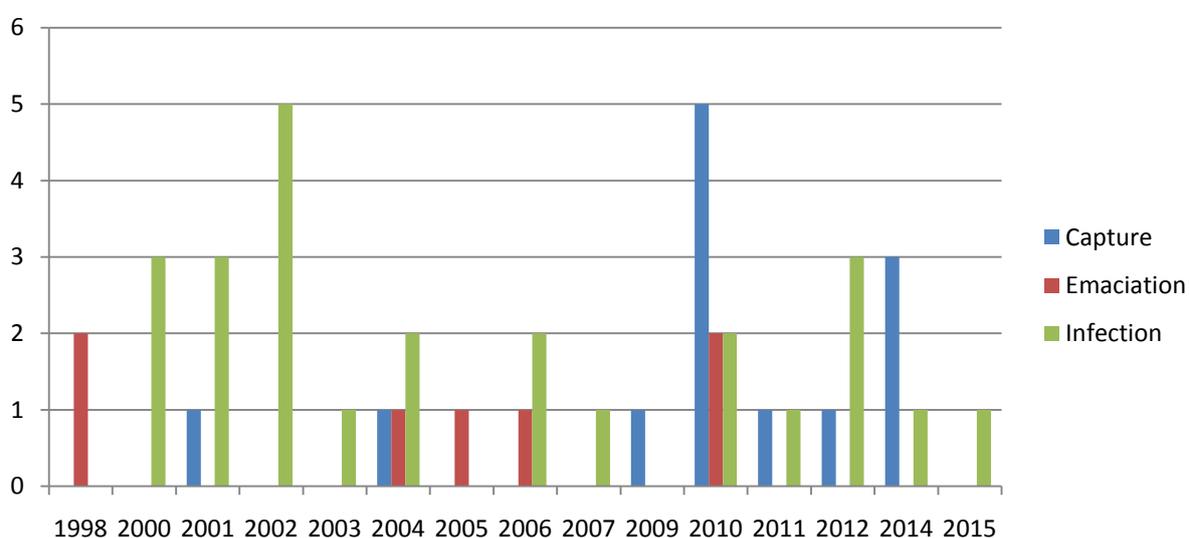


Figure 33: Répartition annuelle des 3 principales causes de mortalité des phoques veaux-marins échoués sur les côtes françaises de la Manche et autopsiés à l'ULg.

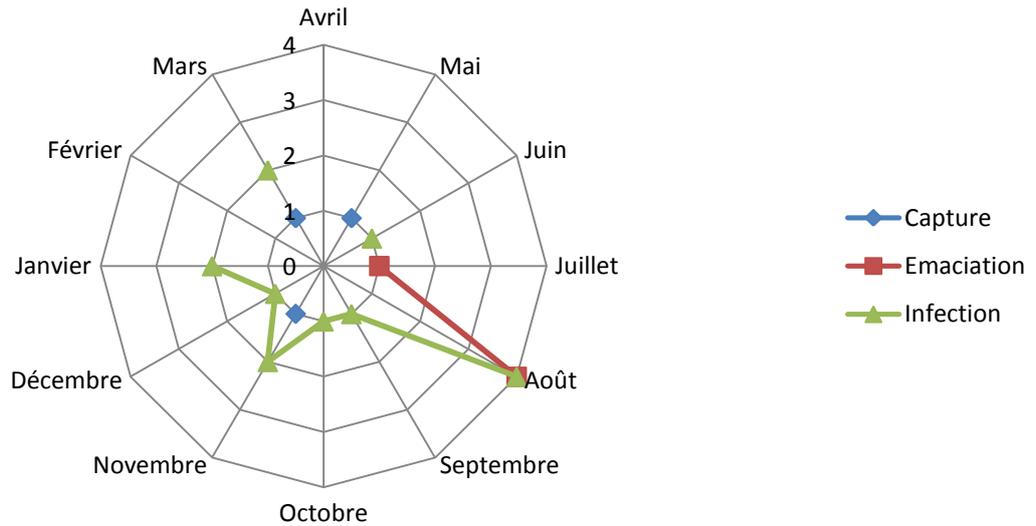


Figure 34: Répartition saisonnière des 3 principales causes de mortalité des phoques communs échoués sur les côtes françaises de la Manche et autopsiés à l'ULg.

Données biologiques:

Parmi les 13 carcasses de phoques veaux-marins dont la cause de la mort est une capture accidentelle, 46,2% (6/13) sont des mâles et 53,8% (7/13) des femelles (fig.35). Les juvéniles représentent la majorité de la population capturée avec un pourcentage de 69,2% (9/13) des individus (fig.36).

En moyenne, les phoques veaux-marins se faisant capturer accidentellement par les filets de pêche ont une longueur totale de 121,15 cm, un poids moyen de 35,3 kg et une épaisseur de lard moyenne de 23,7 mm.

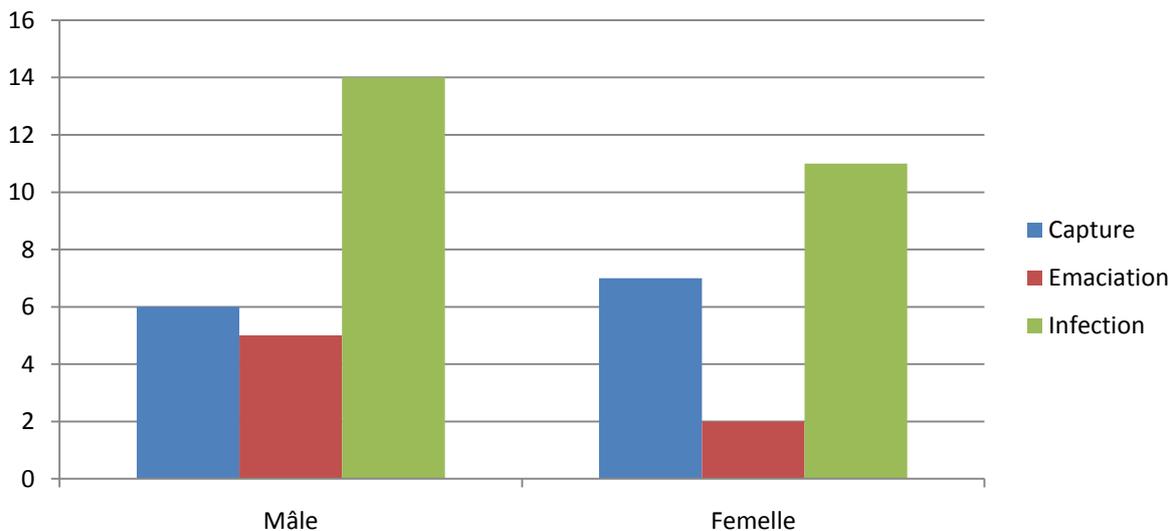


Figure 35: Distribution des phoques veaux-marins échoués suivant la cause de la mort et leur sexe.

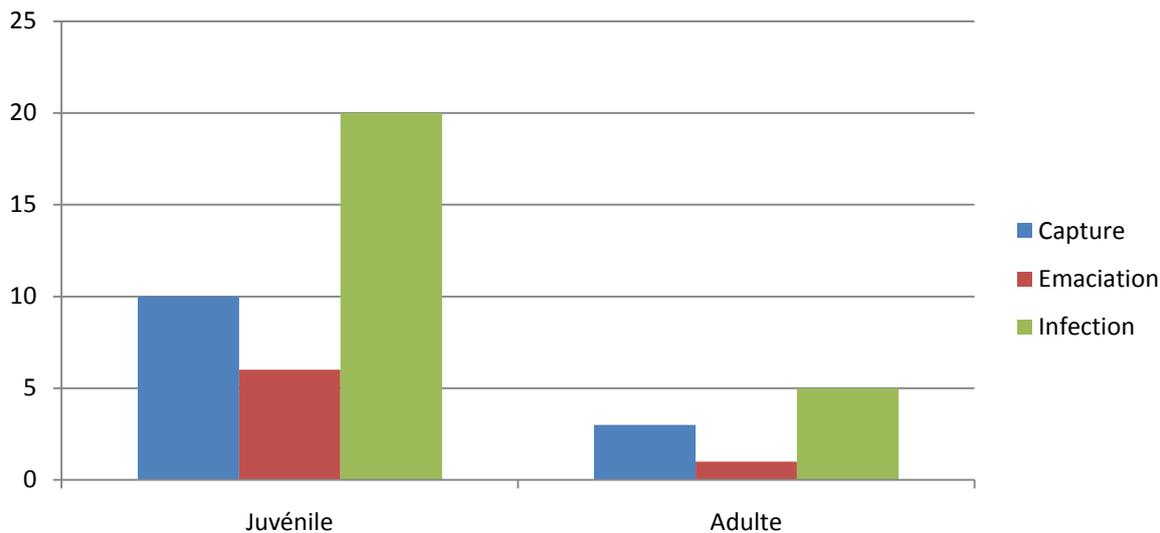


Figure 36: Distribution des phoques veaux-marins échoués suivant la cause de la mort et leur catégorie d'âge.

Données pathologiques:

Les animaux sont en bon état d'embonpoint sauf un qui présentait une émaciation intermédiaire. Ce même individu présentait un estomac vide tandis que les douze autres avaient un contenu alimentaire stomacal. L'épaisseur de lard moyenne de 23,7 mm est tout à fait correcte et assure du bon état corporel des animaux. Dans le cas de capture accidentelle par les filets de pêche, les animaux présentent deux catégories de lésions : celles en rapport avec la capture et celles indépendantes de celle-ci. Dans la première catégorie, on peut relever des lésions faisant suspecter une capture de type hyphéma, hématomes sous-cutanés (6/13), congestion et œdème pulmonaire (12/13) et deux individus présentant des lacérations cutanées, témoins de la capture.

Néanmoins, trois individus présentaient des lésions digestives antérieures à la capture de type stomatite et gastrite, deux individus présentaient des lésions hépatiques et deux autres de la parasitose modérée (fig.37 et 38).

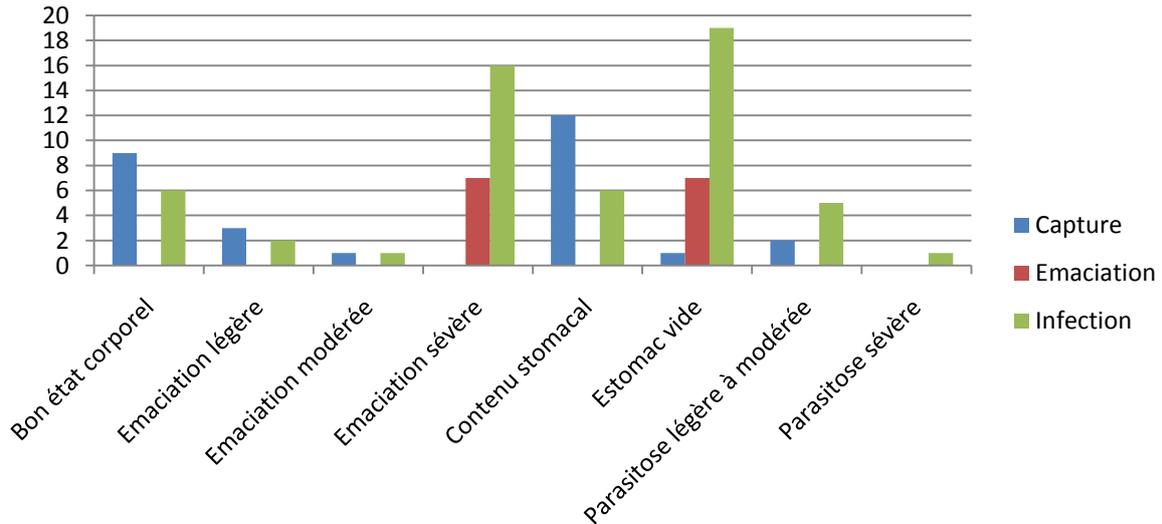


Figure 37: Lésions observées à l'autopsie suivant les trois causes de mortalité principales des phoques veaux-marins échoués sur les côtes françaises de la Manche et autopsiés à l'ULg (1).

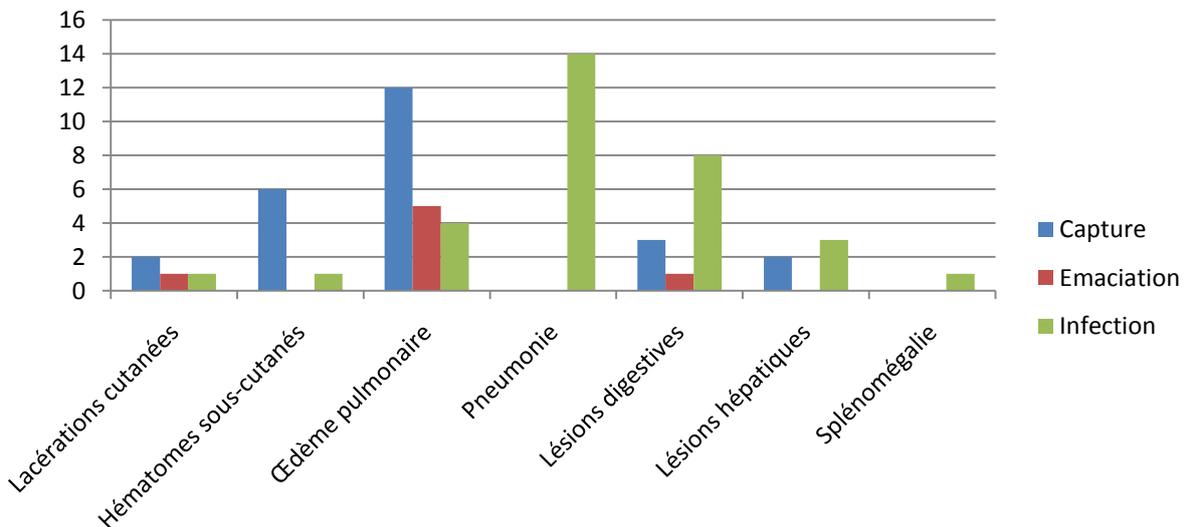


Figure 38: Lésions observées à l'autopsie suivant les trois causes de mortalité principales des phoques veaux-marins échoués sur les côtes françaises de la Manche et autopsiés à l'ULg (2).

- Les causes infectieuses

Pour 25 cas, la mort des phoques veaux-marins échoués était consécutive à un processus infectieux. Pour notre échantillonnage, nous n'observons pas de tendance dans l'évolution annuelle de processus infectieux comme cause de mortalité mais seulement, plus ou moins d'individus suivant les années (fig.33). De même, le faible nombre d'individus dont nous connaissons le mois d'échouage ne permet pas de définir de pic de mortalité mensuel sauf peut-être une tendance en été (fig.34).

Données biologiques:

Parmi les 25 phoques veaux-marins autopsiés, 56% (14/25) sont des mâles et 44% (11/25) sont des femelles (fig.35). Pour l'importance relative des différentes catégories d'âge des phoques veaux-marins échoués morts suite à un processus infectieux, 80% (20/25) sont des juvéniles et 20% (5/25) sont des adultes (fig.36). On peut noter une majorité écrasante de juvéniles mourants d'une infection. Les individus ont une taille moyenne de 113,13 cm, un poids moyen de 22,8 kg et une épaisseur de lard moyenne de 9,1 mm.

Données pathologiques:

La plupart des individus présentaient une cachexie faible (4/25) à sévère (13/25) mais 7 animaux étaient en bon état d'embonpoint. Notons quand même que l'épaisseur de lard moyenne de 9,1 mm est faible, témoignant de l'amaigrissement important de la majorité des animaux morts d'une cause infectieuse. En corrélation avec cette émaciation, à l'autopsie, l'estomac était vide chez 19 phoques tandis que seulement 6 individus présentaient juste un faible contenu alimentaire ou quelques otolithes. Lorsque l'anorexie dure chez les phoques, leur estomac devient tubulaire. Les processus infectieux sont beaucoup moins liés avec la parasitose que chez les marsouins puisque seulement quatre individus présentaient une parasitose légère et un seul une parasitose sévère multilocalisée (fig.37 et 38).

La lésion la plus fréquemment associée au processus infectieux était une pneumonie (14/25) parfois purulente ou hémorragique, souvent aiguë, quelquefois chronique. La pneumonie était la plupart du temps aiguë signalant des complications bactériennes responsables de la mort de l'animal par asphyxie. D'autres lésions étaient parfois présentes de type stomatite ulcérate ou entérite chez 8 animaux, des lésions hépatiques pour 3 phoques, des abcès le plus souvent cervicaux.

- L'émaciation

L'émaciation ou cachexie est un état pathologique de maigreur extrême. De 1995 à 2014, pour les phoques veaux-marins échoués le long des côtes françaises de la Manche et autopsiés à l'ULg, l'émaciation sévère a été responsable de 7 morts. On ne peut pas conclure en une évolution annuelle des cas d'émaciation puisque nous ne comptons que 7 animaux pour une période de 19 ans (fig.33). La plupart des cas d'émaciation sévère surviennent en été (fig.34).

Données biologiques:

Parmi les 11 individus, 28,6% (2/7) étaient des femelles et 71,4% (5/7) sont des mâles (fig.35). En ce qui concerne les différentes catégories d'âge, l'émaciation est responsable de la mort de 6 juvéniles et un seul adulte (fig.36). Les individus présentaient une longueur totale moyenne de 103,1 cm, un poids corporel moyen de 17,6 kg et une épaisseur de lard moyenne de 0,8 mm, témoin de l'émaciation fatale.

Données pathologiques:

L'émaciation est souvent rapportée chez les animaux échoués morts d'un processus infectieux. Dans cette catégorie de 7 individus se retrouvent dès lors seulement les animaux présentant une diminution significative de l'épaisseur de lard sous-cutané avec amyotrophie sévère et disparition de la graisse viscérale, en l'absence de lésions infectieuses ou traumatiques. De plus, parmi les 7 individus, tous présentaient un estomac totalement vide.

En ce qui concerne les lésions visibles à l'autopsie, on observe dans la majorité des cas une congestion généralisée des poumons accompagnée d'un œdème pulmonaire (transsudat pur) du à l'hypoprotéïnémie et de mousse blanche à hémorragique dans les voies respiratoires (fig.37 et 38). Cette mousse est la conséquence de l'œdème pulmonaire.

1.4.2. *Les phoques gris (Halichoerus grypus)*

Pour les phoques gris, nous avons seulement les rapports de cinq individus échoués sur les côtes françaises de la Manche et autopsiés à l'ULg. Au vu du très faible nombre d'animaux, nous allons juste résumer les données d'autopsie pour ces animaux.

Le premier animal s'est échoué en 2003. C'était un mâle adulte de 130 cm et 30 kg. Le code de conservation de l'animal était 4 donc la putréfaction était trop avancée pour observer des lésions.

Le second animal était une femelle juvénile échouée en 2003. Elle faisait une longueur totale de 108 cm, un poids de 18 kg et présentait un code de conservation de 1. Cette jeune phoque présentait une émaciation sévère avec une épaisseur de lard dorsal de seulement 8 mm. De la parasitose et une pneumonie ont aussi été notée amenant à suspecter un processus infectieux comme cause de la mort.

Le troisième animal était un mâle adulte de 250 cm, 250 kg, échoué le 30 Août 2007. Le code de conservation était 2 donc l'autopsie a pu amener des observations intéressantes. L'épaisseur de lard dorsal du phoque était 40 mm donc un animal en bon état d'embonpoint. Il présentait un estomac plein avec 6,6 kg de contenu alimentaire. Les poumons présentaient un emphysème, de la congestion et de l'œdème pulmonaire. De la mousse hémorragique était présente dans les voies respiratoires. La trachée contenait un poisson entier. Ses observations ont conduit à conclure à une mort par asphyxie à cause de l'obstruction de la trachée.

Le quatrième phoque gris s'est échoué en 2012. Il s'agissait d'un mâle juvénile de 114 cm, de 19,7 kg. L'animal présentait un code de conservation de 2. L'estomac présentait un contenu alimentaire récent et abondant. A l'autopsie, il a été noté une émaciation sévère révélée entre autres par une épaisseur de lard dorsal de 9 mm, une pneumonie aiguë, des parasites dans les voies respiratoires et des acariens (*Halarachnidae*) dans les narines. La pneumonie et la parasitose suggèrent une mort suite à un processus infectieux. L'émaciation sévère est la conséquence de la maladie et de l'affaiblissement de l'animal.

Enfin, le dernier phoque gris s'est échoué sur une plage française en mai 2015. C'était un mâle adulte de 210 cm de long pour un poids corporel estimé à 120 kg. L'épaisseur de lard sous-cutané dorsal était de 8 mm, mettant en évidence une émaciation sévère de l'animal. Lors de l'examen d'autopsie, un jetage hémorragique bilatéral a été noté ainsi qu'un hyphéma bilatéral. A l'ouverture de la cavité thoracique, le poumon présentait une congestion et un œdème pulmonaires sévères associés à une abondante mousse séro-hémorragique dans les voies respiratoires. L'estomac présentait un contenu abondant et récent de 500 g ainsi que quelques otolithes. La mort a été causée par l'œdème pulmonaire très vraisemblablement consécutif à l'émaciation sévère de l'animal. Le jetage hémorragique ainsi que l'hyphéma bilatéral peuvent faire suspecter un trauma.

1.5. Conclusion et discussion sur les échouages

Depuis 1995, les échouages de mammifères marins ne cessent d'augmenter, 2013 ayant été une année record. L'espèce marine qui représente la grande majorité des échouages sur les côtes françaises de la Manche est celle des marsouins communs. Une saisonnalité est marquée avec un pourcentage d'échouages plus important en fin d'hiver-début du printemps. Les individus échoués sont majoritairement des mâles juvéniles et des femelles adultes. La capture par des filets de pêche est la principale cause de mortalité, suivie de très près par des

causes infectieuses. De nouvelles causes d'échouage apparaissent comme l'émaciation sévère ou encore plus récemment la prédation par les phoques. Pour les phoques veaux-marins, les juvéniles sont la population la plus touchée par les échouages. Ils surviennent en majorité en été lors du sevrage des jeunes de l'année. Les infections sont majoritairement à l'origine de la mort de ces animaux. Comme pour les marsouins, l'émaciation sévère représente une cause de mortalité non négligeable. Ces conclusions ont été le résultat de l'étude statistique des échouages sur une vaste période de 19 ans. La suite de cette partie sera dédiée à la compréhension des résultats obtenus en prenant en compte le mode de vie des mammifères marins, l'évolution démographique des différentes populations et les menaces pesant sur ces animaux.

Concernant les marsouins communs, historiquement, à partir des années 90, une augmentation progressive des échouages est observée jusqu'à atteindre des années record comme 2013 avec 333 échouages sur les côtes françaises de la Manche (Van Canneyt *et al.*, 2015). Le nombre d'animaux échoués avait déjà été multiplié par deux entre 2011 et 2012 mais a encore été multiplié par 1,8 entre 2012 et 2013. En 2014, on retrouve des effectifs semblables à ceux de 2011 et de 2012 laissant supposer que l'année 2013 était un événement d'échouages importants, inhabituel et ponctuel (Van Canneyt *et al.*, 2015). Les juvéniles représentent la majorité des animaux échoués puisque ce sont généralement des jeunes de l'année qui ont un mode de vie plus côtier que les parents et peuvent plus facilement se faire capturer par les filets de pêche. Les causes de l'augmentation aux fils des ans des échouages sur les côtes françaises de la Manche peuvent correspondre à une anomalie d'abondance du marsouin commun dans nos eaux côtières ou à une augmentation anormale du taux de mortalité dans cette espèce. En réalité, la réponse est plus complexe et fait intervenir la combinaison de plusieurs facteurs. Tout d'abord, il ne faut pas omettre le fait que le pointage et le suivi des échouages de mammifères marins sur les côtes françaises a connu un véritable essor dans les années 90, entraînant progressivement un meilleur suivi des animaux échoués à partir de cette période. Ensuite, la largeur de la Mer du Nord étant de 300 km au Nord et de 50 km au Sud, les carcasses d'animaux morts ont une plus grande probabilité de s'échouer sur les côtes de la baie Sud de la Mer du Nord (Haelters et Camphuysen, 2009). Cette hypothèse est appuyée par le fait que les courants marins dans cette mer sont Nord-Sud et Est-Ouest, amenant ainsi les carcasses sur les côtes belgo-françaises. Troisièmement, le réchauffement

climatique et le manque de proies dans les eaux septentrionales ou la migration de celles-ci, ont conduit les marsouins à descendre vers le Sud. Ce point est illustré par les données recueillies par les études SCANS (Small Cetaceans in European Atlantic North Survey) qui dénombrent les petits cétacés à large échelle. Il y a eu deux campagnes, la première en 1994 et la seconde en 2005 (Haelters et Camphuysen, 2009). Les résultats sont similaires pour les deux études avec une estimation de 340 000 petits cétacés dans l'Atlantique Nord Européen. Cependant, les scientifiques ont observé un changement de distribution Nord/Sud du marsouin commun avec des effectifs beaucoup plus importants dans le Sud en 2005 (SCANS II). L'âge moyen des individus échoués ne diffère pas de manière significative entre les années donc l'augmentation de la population est bien due à une migration et non pas à une augmentation interne. Enfin, l'apparition de nouvelles causes de mortalité comme l'émaciation sévère ou la prédation par les phoques associée à l'augmentation considérable de l'incidence des captures accidentelles par les filets de pêche, attestée par de nombreuses études, augmentent le nombre d'échouages annuel. Afin d'illustrer cette donnée, dans les années 90, le taux de capture accidentelle par les pêcheries était de 20% (Jauniaux *et al.*, 2013), dans notre étude, le taux entre 2000 et 2014 est de 45%. Ce taux très important est retrouvé dans différentes études comme en Belgique avec un pourcentage de 38,1% entre 2001 et 2011, en Allemagne avec un taux de 50% ou encore aux Pays-Bas, 40% (Jauniaux *et al.*, 2013). L'accroissement drastique du nombre d'échouages des marsouins communs est donc expliqué pour partie par les captures accidentelles qui devient une menace significative pour ces petits cétacés le long de nos côtes. Ce taux est en plus sûrement sous-estimé en raison de la difficulté à conclure avec certitude sur la cause de la mort et à relever des empreintes de filets significatives ; mais aussi en raison des cas de captures dans des engins de pêche où les pêcheurs lestent les cadavres dans la crainte de recevoir une amende.

De nombreuses études attestent d'une saisonnalité au sein des échouages de marsouins communs (Haelters et Camphuysen, 2009 ; Jauniaux *et al.*, 2013). Dans notre étude, le pic d'échouages se situe fin de l'hiver, début de printemps, de Février à Avril. Il correspond au pic de captures accidentelles par les filets de pêche. Cette période correspond à la mise en place de filets maillants sur les plages pour la pêche à la sole qui apparaissent comme une méthode de pêche écologique face aux chalutiers mais sont en réalité une cause majoritaire de capture chez les marsouins qui sont des animaux côtiers. Il existe une corrélation positive entre la distribution, l'abondance des marsouins et leurs proies et donc aux activités halieutiques ciblant celles-ci. Le code de conservation des animaux capturés par les filets

étant inférieur à 3, la mort a eu lieu près des plages donc provenant plutôt de pêcheries dans cette zone.

Afin de lutter contre cette menace, la commission européenne a mis en place le règlement 812/2004 visant à réduire les prises accidentelles de cétacés dans les engins de pêche (Haelters et Camphuysen, 2009). Ce règlement datant du 26 avril 2004 établit les mesures relatives aux captures accidentelles de cétacés et modifie le règlement précédent CE 88/1998 (Haelters et Camphuysen, 2009).

Trois points principaux ont été notifiés : la mise en place de pingres (appareils produisant des bruits métalliques) pour éloigner les petits cétacés des filets ; l'abandon des filets dérivants en Mer Baltique ; le développement d'observateurs indépendants pour les engins de pêche. Malheureusement, ce règlement ne prévoit pas la mise en place d'observateurs pour les filets calés sur les côtes de la Manche, zone concernée par l'installation de pingres par les fileyeurs de plus de douze mètres (Van Canneyt *et al.*, 2006).

L'observation du nombre important d'échouages en fin d'hiver, début du printemps correspond aussi aux mois où l'animal est abondant sur nos côtes avant de retourner à sa zone de parturition de l'été qui est le Dogger Bank, entre l'Angleterre et le Danemark (Haelters et Camphuysen, 2009).

Depuis les années 70, l'étude des échouages révèle un pourcentage de plus en plus élevé de juvéniles échoués par rapport aux adultes. Entre 1970 et 1999, 56% des animaux échoués correspondaient à des femelles mais depuis 2000, 59% sont des mâles. Le changement de sexe-ratio coïncide avec l'augmentation des échouages depuis 1999 (Van Canneyt *et al.*, 2015). En combinant ces deux données, l'augmentation drastique du nombre d'échouages est causée par la mortalité importante des mâles juvéniles. Ceci pourrait venir du fait que les jeunes mâles se regroupent en petits troupeaux et ont un comportement plus côtier, augmentant ainsi la prise accidentelle par les filets de pêche (Samaran *et al.*, 2011). Ceci est confirmé par le plus grand nombre de mâles juvéniles capturés par les filets de pêche dans notre étude. Certains auteurs évoquent un manque d'expérience des juvéniles face aux filets de pêche (Santos et Pierce, 2003), mais cette donnée n'explique pas la différence que l'on peut observer entre mâles et femelles. Globalement, on peut observer qu'il y a plus de mâles juvéniles et de femelles adultes qui s'échouent. Cette donnée est d'une part surprenante. En effet, pour les adultes, la cause de mortalité par un processus infectieux est souvent attribuée, dans de nombreuses études, à la dépression immunitaire induite par la contamination de ces

animaux par des xénobiotiques lipophiles. Or, des études ont montré que la concentration en contaminants lipophiles dans le lard des mâles marsouins augmente de façon linéaire et progressive tout au long de leur vie. Chez les femelles, l'augmentation est linéaire jusqu'à la maturité sexuelle. Quand les femelles deviennent adultes, la concentration en contaminants dans leur lard décrit une courbe sinusoïdale à des concentrations toujours inférieures à celles des mâles du même âge. Ceci s'explique par le fait qu'en fin de gestation et lors de la lactation, les graisses sont mobilisées pour la production du lait. Les contaminants sont donc remis en circulation et sont excrétés dans le lait. Le petit se retrouve donc contaminé dès sa première tétée (Haelters *et al.*, 2011). D'autre part, le plus grand pourcentage de femelles adultes échouées est biaisé par l'effort de récupération de femelles échouées dans les années 2000 pour étudier la pollution des mers. En effet, les cétacés sont au sommet de la chaîne alimentaire et sont donc le reflet de la pollution aquatique (Haelters et Camphuysen, 2009). Rappelons aussi que le réseau d'échouage français est constitué de beaucoup de bénévoles et donc tous les animaux échoués sur nos côtes ne sont pas récupérés pour autopsie et analyse.

Si l'augmentation du nombre de marsouins communs dans la baie Sud de la Mer du Nord explique en partie une augmentation proportionnelle du nombre d'échouages, elle induit aussi une compétition pour l'accès aux ressources. Les marsouins sont des animaux qui ont besoin de se nourrir en permanence (Santos et Pierce, 2003). Une compétition plus grande pour l'accès aux ressources entraîne une augmentation du nombre d'animaux émaciés et donc de décès et d'échouages. Les cas d'émaciation sévère sont rapportés en Juin et en Juillet et correspondent la plupart du temps aux jeunes sevrés de l'année. Le fait que des adultes meurent de cachexie tend à appuyer l'hypothèse d'une diminution des ressources alimentaires le long de nos côtes et/ou à une compétition accrue pour ces ressources. De même que l'épaisseur de la couche de lard sous-cutanée est fréquemment inférieure au 30 mm attendue chez un animal en bon état corporel. Ceci est attesté par le fait que sur les 156 individus présentant un code de conservation strictement inférieur à 3, plus de la moitié d'entre eux présentaient un estomac vide quelque soit la raison de la mort, même en cas de capture. Cette compétition ne pourrait pas seulement être intra-espèce et expliquerait l'observation récente d'attaques par des phoques gris. Ce n'est pas un phénomène isolé puisqu'il a été relevé en France, en Belgique, en Angleterre et aux Pays-Bas (Bouveroux *et al.*, 2014 ; Leopold *et al.*, 2015 ; Jauniaux *et al.*, 2014). Le marsouin commun est déjà connu pour être la proie des orques et des requins blancs. Dans la Manche et la Mer du Nord, des interactions létales avec le grand dauphin (*Tursiops truncatus*) ont été décrites. Mais les premières observations de

prédation par les phoques gris ont été signalées en Belgique en 2011 à partir de deux marsouins échoués présentant des lésions de type « morsures » et dont de large bandes de peau et de lard sous-cutané étaient manquantes. La conclusion a été énoncée à partir d'analyses morphologiques grâce aux mesures des distances entre les canines et entre la mandibule et la maxillaire (Haelters *et al.*, 2012). Seul le phoque gris peut infliger ce genre de morsure dans la Mer du Nord. La prédation et le charognage par les phoques a été, quelques années plus tard, directement observé dans la Manche (Bouveroux *et al.*, 2014). La plupart des animaux prédatés étaient des juvéniles en bon état d'embonpoint et avec des estomacs remplis (Leopold *et al.*, 2015). Pour avoir la confirmation, il faut isoler l'ADN de marsouin dans l'estomac de phoques gris ou bien isoler l'ADN de phoques gris dans les blessures des marsouins échoués. C'est cette deuxième possibilité qui a été privilégiée par le monde scientifique. L'écouvillonnage de plaies et la PCR ciblant l'ADN mitochondrial des phoques gris ont permis de confirmer cela (Jauniaux *et al.*, 2014 ; Van Bleijswijk *et al.*, 2014). Il faudrait savoir si ce comportement relève de la simple prédation ou représente une combinaison de prédation et de compétition. Cela est difficile à trancher puisque ce comportement n'est observé que depuis récemment. Cependant, rappelons que le marsouin commun était beaucoup moins abondant dans les années 90 dans nos eaux (SCANS II), ce qui peut expliquer que ce genre de comportement n'ait pas été observé. En parallèle, les populations de phoques gris croissent dans la Mer du Nord et la Manche, augmentant ainsi la compétition pour les ressources et encourageant certains individus à s'intéresser à d'autres proies comme le marsouin (Haelters *et al.*, 2012). Nous ne pouvons dire avec certitude si c'est un phénomène récent de type territorialité ou un phénomène auparavant passé inaperçu même si les professionnels pensent plutôt à la première hypothèse. Enfin, cette compétition augmente certainement le stress des animaux, qui, combiné à un apport énergétique moindre, entraîne une dépression du système immunitaire et donne un terrain propice au développement de maladies infectieuses. Dans notre étude, 5 individus décédés de capture par les filets de pêche présentaient des lésions type prédation par les phoques, un animal cachectique également et un dernier individu est décédé des suites de la prédation.

Jusqu'en 2003, les processus infectieux représentaient la cause de mortalité prédominante dans les échouages de marsouins communs. Depuis, une inversion s'est produite avec les captures accidentelles par les filets de pêche qui occupent largement la première place. La saisonnalité des captures accidentelles par les filets de pêche a été vue précédemment. Celle des morts suite à un processus infectieux présente des pics en hiver et en

août, que nous ne pouvons expliquer. Lors d'infection, les marsouins présentent principalement des lésions de pneumonie ou bronchopneumonie et de l'émaciation fortement liées à des parasitoses sévères. Nous pensons que les parasites profitent d'une faiblesse immunitaire de l'animal pour l'infester. Les pneumonies observées lors de l'autopsie sont souvent d'origine vermineuse avec des surinfections bactériennes ayant entraîné la mort de l'animal. Cependant, notons qu'un nombre non négligeable d'animaux certainement décédés des suites d'une infection sont en bon état corporel et/ou ne présentent pas d'infestation parasitaire. Certains présentent même des hématomes sous-cutanés pouvant faire suspecter dans un premier temps une prise dans des filets de pêche. De même, tous les animaux capturés dans des filets de pêche ne sont pas exempts de lésions inflammatoires ou de parasitisme. Ils ne sont également pas tous en bon état d'embonpoint.

Il faut donc rester prudent, aucun critère spécifique ne permet de conclure avec certitude sur la cause de la mort. C'est la combinaison de toutes les observations lors de l'autopsie qui permet d'émettre une cause probable de la mort qui sera ensuite confirmée par des données d'anatomopathologie, d'histologie et de biologie moléculaire.

Concernant l'échouage des phoques veaux-marins, la série temporelle des échouages révèle une tendance linéaire à l'augmentation depuis les années 90. Sur la saison 2012-2013, il y a eu une augmentation du nombre d'échouages de près de 50%, augmentation qui s'est confirmée sur la saison suivante 2013-2014 avec 78 veaux-marins échoués (Van Canneyt *et al.*, 2015).

La distribution spatiale des échouages des phoques communs est très localisée avec la mise en évidence de spots d'échouages correspondant assez bien à la présence de colonies. Les principaux sites concernés sont les environs de la Baie de Somme, la côte d'Opale et dans une moindre mesure, la Baie de Veys, la Baie de Seine et la Baie du Mont-Saint-Michel.

La distribution saisonnière des échouages des phoques veaux-marins présente une saisonnalité assez marquée même pour notre échantillonnage. Le pic d'abondance d'échouages se situe pendant la période estivale et particulièrement au mois d'août. Ceci correspond à la période de mise-bas (juin-juillet) quand les jeunes de l'année fraîchement sevrés présentent des difficultés pour se nourrir (Van Canneyt *et al.*, 2015). C'est pour cette raison que quelque soit la cause de la mort, les juvéniles représentent la large majorité des

animaux échoués. Remarquons néanmoins que des échouages surviennent tout au long de l'année.

Parmi les individus échoués et autopsiés, nous notons qu'il y a peu d'adultes. Cette observation est la conséquence de l'échouage important de juvéniles mais aussi du fait que les adultes sont souvent laissés sur la plage car ils sont trop gros pour être pris en charge. Rappelons que le Réseau d'échouage français est constitué de professionnels mais surtout d'une grande majorité de bénévoles qui ne sont pas toujours présents lors d'un échouage.

En ce qui concerne les causes de la mort, un processus infectieux semble la première cause de mortalité chez les phoques communs, suivi des captures accidentelles et enfin d'une émaciation sévère. Les captures accidentelles par les filets de pêche sont une cause de mortalité sous-estimée puisque contrairement aux marsouins, les empreintes de filets disparaissent rapidement chez les phoques à cause de leur fourrure épaisse (Jauniaux *et al.*, 2013).

La pneumonie est la lésion prédominante en cas d'infection. Cette lésion est probablement la conséquence d'une infection par le *Morbillivirus*, qui est une dominante pathologique chez le phoque. Enfin, l'émaciation sévère de plusieurs individus est un fait important posant la question de la disponibilité de proies pour les mammifères marins de nos côtes. Parmi les sept individus morts suite à une cachexie extrême, six sont des juvéniles de l'année, donnée confirmée par le fait que leur mort est survenue en juillet-août lors de la période de mise-bas. Ils ont épuisé leur réserve graisseuse et n'ont pas su ou pu chasser. Notons quand même qu'un adulte est aussi mort d'émaciation sans qu'un foyer infectieux n'ait été mis en évidence. Le fait que des adultes puissent décéder de famine laisse à penser que l'abondance en proies est faible.

Enfin, il faut réaliser que les lésions ne sont pas l'exclusivité d'une seule cause de mortalité. Ainsi, un individu décédé des suites d'une capture accidentelle par les filets de pêche ne présentait pas un bon état corporel alors que l'on s'attendrait plutôt à observer des animaux en bon état d'embonpoint. Certains animaux capturés présentaient aussi des lésions digestives et/ou hépatiques ou encore des infestations parasitaires. De même, un nombre non négligeable d'individus probablement morts suite à un processus infectieux étaient en bon état d'embonpoint et présentaient un contenu stomacal plus ou moins abondant et récent.

Chaque année, environ la moitié des phoques s'échouent vivants et sont donc pris en charge par des organismes spécialisés. Suivant la localisation de l'échouage, les phoques trouvés vivants sont orientés vers une structure habilitée à les accueillir, les soigner puis les relâcher en mer. Les centres de soins sont Océanopolis, Picardie Nature, la Ligue Protectrice des Animaux du 62 et le Musée de la Mer (64). Ces centres présentent un taux de réussite de 75-80%. Certains centres appelés de transit peuvent recevoir temporairement des animaux en attendant leur placement dans un centre de soins.

2. PARTIE 2 : Etude de la Brucellose chez les Mammifères marins échoués sur les côtes françaises de la Manche de 1995 à 2015.

Depuis la première observation de *Brucella* chez les mammifères marins en 1994, de nombreuses études ont été menées dans le but de déterminer les données épidémiologiques et pathologiques de cette bactérie dans la faune sauvage marine. A notre connaissance, aucune étude de prévalence ou de mise en évidence de lésions dues à *Brucella* n'a été réalisée sur les côtes métropolitaines françaises. Cette donnée est pourtant très importante pour la santé publique. En effet, la brucellose est une maladie infectieuse zoonotique. Les échouages de marsouins communs et de pinnipèdes augmentent de plus en plus, exposant le public mais aussi les professionnels à une possible contamination par la brucellose. Pour notre étude, la façon la plus simple et la moins invasive pour les animaux d'accéder à des prélèvements de mammifères marins est de s'intéresser aux animaux échoués autopsiés par l'Ulg. Ces mêmes animaux ont fait l'objet de l'étude statistique de la partie 1. Nous avons choisi de rechercher la bactérie *Brucella spp.* dans les organes de mammifères marins échoués sur les côtes françaises depuis 1995 par Polymerase Chain Reaction en temps réel (RT-PCR) puisque c'est une méthode simple, rapide et très sensible. D'autre part, pour les animaux positifs par PCR, nous nous sommes intéressés à l'histologie pour déterminer d'éventuelles lésions associées à l'infection et réalisés des expériences d'immunohistochimie permettant de révéler les antigènes bactériens dans des coupes de tissus. Enfin, le séquençage des produits de PCR par la méthode de Sanger a permis de confirmer la présence de la bactérie dans les organes testés.

Les mammifères marins échoués sur les côtes françaises de la Manche et autopsiés à la Faculté Vétérinaire de Liège sont listés en Annexe. Parmi ces animaux, des échantillons de 55 marsouins juvéniles, 26 marsouins adultes, un dauphin commun, un lagénorrhynque à bec blanc, trois globicéphales, 20 phoques veaux-marins juvéniles, 6 phoques communs adultes et un phoque gris adulte stockés à -20°C ont été testés pour la présence de *Brucella spp.*

Chez les mammifères marins, les organes dans lesquels *Brucella* est le plus souvent isolée sont les poumons et les nœuds lymphatiques des régions thoraciques et cervicales (Garner *et al.*, 1997 ; Foster *et al.*, 2002 ; Prenger-Berninghoff *et al.*, 2008). Nous avons ainsi décidé de tester les animaux ayant un code de conservation inférieur ou égal à 3 et pour

lesquels nous possédions les échantillons de poumons et d'au moins un des trois nœuds lymphatiques suivants : nœud lymphatique préscapulaire, nœud lymphatique bronchique et nœud lymphatique pulmonaire, qui sont les trois nœuds lymphatiques les plus souvent prélevés lors de l'autopsie. Après ce tri, il restait 42 marsouins communs, le dauphin commun, le lagénorrhynque à bec blanc, les trois globicéphales et 10 phoques communs. Pour la recherche de *Brucella spp.*, les 57 individus ont été testés par real time-PCR en réalisant un « pool » d'organes (poumon et au moins un des trois nœuds lymphatiques d'intérêt). Le CERVA ayant déjà testé certains individus nous avons ajouté à notre étude un phoque gris (A12/1999) dont nous n'avions que le poumon et un marsouin commun (A09/1943) dont seul le nœud lymphatique bronchique était en notre possession. Nous avons donc testé en tout 59 mammifères marins.

Les échantillons revenus positifs par RT-PCR ont ensuite été testés par PCR classique en vue de réaliser le séquençage des produits de PCR pour affirmer la présence de *Brucella*. En parallèle, les animaux dont les organes se sont révélés positifs par RT-PCR ont été testés par immunohistochimie. L'ensemble des organes ayant subi cette méthode diagnostique sont : l'encéphale, le cœur, le poumon, les nœuds lymphatiques, le foie, le rein, la rate, la glande mammaire, le testicule, l'ovaire et l'utérus. Pour chaque individu testé, tous les organes précédemment cités n'avaient pas été prélevés.

2.1. Matériels et Méthodes

2.1.1. Manipulation de l'ADN

L'extraction de l'ADN à partir des organes décongelés a été réalisée grâce au kit NucléoSpin® Tissue de Macherey-Nagel en suivant les recommandations du fournisseur. Pour chaque individu, nous avons regroupé les différents organes en une seule extraction.

L'extraction et la purification d'ADN à partir de gel d'agarose 2% est réalisée grâce au kit NucléoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fournisseur.

2.1.2. Real Time PCR

Nous avons utilisé un StrepOne Plus Real-Time PCR System Software (Applied Biosystem) pour la PCR quantitative en temps réel. Le mélange réactionnel est réalisé sous

hotte dans une microplaque. Chaque puits contient 12,5 µL de MasterMix du kit FFPE DNA (Macherey-Nagel), 0,4 µL de sonde (6FAM-AAATCTTCCACCTTGCCCTTGCATCA-BHQ1), 0,8 µL de chacune des amorces Forward et Reverse (5'-GCTCGGTTGCCAATATCAATGC-3' et 5'-GGGTAAAGCGTCGCCAGAAG-3'), 2 µL d'ADN, H2O qsp 25 µL. Les amorces et la sonde ciblent le gène *bcs31*. Chaque échantillon est analysé en double. Le témoin positif est constitué d'ADN de *Brucella ceti* BI/94. La dénaturation initiale s'effectue à 95°C pendant 10 min. Elle est suivie de 55 cycles successifs : dénaturation à 95°C pendant 20 secondes, hybridation à 55°C pendant 30 secondes et polymérisation à 72°C pendant 1 minute. Enfin, la PCR est terminée par une phase d'élongation finale de 10 minutes à 72°C. Les résultats sont donnés sous la forme d'un nombre de cycles nécessaires pour atteindre le seuil de détection (Ct).

2.1.3. *Fixation des tissus sur les lames*

Les échantillons de tissus sont inclus en paraffine et coupés au microtome réglé à 5 µm. Pour chaque organe, deux lames sont préparées. Afin de déparaffiner et réhydrater les coupes, les lames sont placées pendant 10 minutes dans trois bains successifs de solvant (SafeSolv QPath® de VWR Chemicals). Elles subissent ensuite trois bains successifs de 2 minutes dans 100% d'éthanol. Un bain de 2 minutes dans l'éthanol 90% puis un bain de 2 minutes dans l'éthanol à 50% complètent le cycle. Les lames sont conservées dans l'eau distillée en attendant de subir le protocole d'immunohistochimie.

2.1.4. *Immunohistochimie*

Les lames sont lavées 5 minutes (PBS 1X, NaCl 500mM, Twin20 0,2%) puis incubées 10 minutes dans du peroxyde d'hydrogène à 0,3% afin de supprimer les peroxydases endogènes. Elles sont à nouveau lavées 5 minutes puis saturées pendant 10 minutes (Protein block de Dako: PBS 0,25% caséine et sodium azide). Pour chaque organe testé, une lame est incubée pendant 1 heure avec l'anticorps (Ac) primaire polyclonal anti-LPS de *Brucella melitensis* 16M obtenu chez le lapin, dilué à 1/100 dans du PBS 1X (Dako). L'autre lame est incubée 1 heure dans du PBS 1X seul; elle servira à tester la spécificité de l'Ac secondaire. Après un lavage de 5 minutes, les deux lames sont incubées 30 min avec l'Ac secondaire, un anti-IgG de lapin conjugué à l'HRP obtenu chez la souris (Dako), dilué au 1/50000. Après un rinçage de 5 minutes, les lames sont révélées par ajout d'AEC pendant 10 minutes. Après deux lavages à l'eau distillée, on applique l'hématoxyline de Gill pendant 1 minute. L'étape

finale fait intervenir un rinçage à l'eau distillée durant 3-4 minutes et le montage des lamelles. Les lames sont observées au microscope à contraste de phase (Médio plan de Jeulin). Le témoin positif utilisé est une coupe de rate d'un marsouin échoué sur la côte belge en 2008 (Jauniaux *et al.*, 2010).

2.1.5. *PCR classique*

Les amorces utilisées permettent d'amplifier 151pb du gène *bcs31* et 523 pb du gène *omp25* (5'-GCTCGGTTGCCAATATCAATGC-3' et 5'-GGGTAAAGCGTCGCCAGAAG-3' ou 5'-GTTCCGGCTCCGGTTGAAGTA-3' et 5'-CGCGGATATCCTGCGTGTC-3', respectivement). La réaction est réalisée en microplaque et chaque échantillon est analysé en double. Par puit, le mélange réactionnel contient 10µL de HotStarTaq® Plus Master Mix Kix (Qiagen), 1 µL de chacune des amorces, 2 µL d'ADN, H₂O qsp 20 µL. Le témoin positif est constitué d'ADN de *Brucella ceti* BI/94. La dénaturation initiale s'effectue à 95°C pendant 10 minutes. Elle est suivie de 60 cycles successifs : dénaturation à 95°C pendant 20 secondes, hybridation à 55°C pendant 30 secondes et polymérisation à 72°C pendant 1 minute. L'élongation finale est réalisée à 72°C pendant 10 minutes. Les amplicons sont visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose 2% à l'aide d'un marqueur de poids moléculaire 1kb (O'Gene Ruler 1 kb Plus DNA ladder, Thermo Fisher Scientific).

2.1.6. *Séquençage SANGER*

Le séquençage des fragments PCR obtenus a été réalisé par GATC Biotech sur 5 µl d'ADN purifié concentré à 20-80 ng/µL et avec une amorce à 5 µM.

2.2. *Recherche de Brucella spp. par RT-PCR*

La recherche de *Brucella spp.* par RT-PCR a ciblé le gène *bcs31* qui code pour une protéine de 31 kDa, très bien conservée au sein du genre *Brucella* (Probert *et al.*, 2004).

2.2.1. *Droite de calibration de la RT-PCR*

Afin de vérifier la validité et l'efficacité du protocole de RT-PCR que nous voulions utiliser, le CERVA nous a fourni une solution d'ADN de *Brucella ceti* B1/94 concentrée à 90 ng/µL. A partir de cette solution de départ, nous avons réalisé des dilutions afin de réaliser une courbe standard de la réaction de RT-PCR.

Pour connaître la quantité d'ADN dans notre échantillon, il faut déterminer la masse d'une molécule d'ADN de *Brucella ceti* B1/94 dans notre échantillon. Le site du National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) permet de trouver la longueur totale moyenne du génome de *Brucella ceti* qui est de 3,34 Mb soit $6,68 \times 10^6$ nucléotides dans un génome.

Masse d'un génome de *Brucella ceti* = $6,68 \times 10^6 \times (330/6,02 \times 10^{23}) = 3,66 \times 10^{-6}$ ng
Masse molaire d'un nucléotide = 330 g/mol
Nombre d'Avogadro = $6,02 \times 10^{23}$ /mol

Le CERVA nous a fourni une solution de 70 μ L concentrée à 90 ng/ μ L soit $2,46 \times 10^7$ génomes de *Brucella* par μ L. Ainsi dans 4 μ L de la solution, il y avait 10^8 génomes.

Afin de réaliser la courbe standard, nous avons dilué par 50 la solution de départ afin d'obtenir une solution concentrée à 10^6 génomes par μ L. Six dilutions par 10 se sont succédées afin d'obtenir des solutions de concentrations respectives de 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 et 1 génome de *Brucella ceti* B1/94 par μ L.

Le protocole de RT-PCR a été appliqué pour ces 7 dilutions et l'amplification a fonctionné (tableau 19).

Tableau 19 : Résultats de la RT-PCR pour les sept dilutions de la solution de génome de *Brucella ceti* B1/94.

| Dilutions | Résultat de la RT-PCR |
|----------------------------|-----------------------|
| 10^6 génomes par μ L | Ct=22,98 |
| 10^5 génomes par μ L | Ct=27,07 |
| 10^4 génomes par μ L | Ct=29,97 |
| 10^3 génomes par μ L | Ct=33,86 |
| 10^2 génomes par μ L | Ct=37,60 |
| 10 génomes par μ L | Ct=42,46 |
| 1 génome par μ L | Ct=45,39 |

A partir de ce résultat, nous avons modélisé la droite de calibration qui définit la quantité de génome de *Brucella* dans l'échantillon en fonction du cycle seuil (Ct) obtenu lors de la RT-PCR (fig.39).

L'équation de la droite nous a donné deux informations supplémentaires. L'ordonnée à l'origine de 45,50 représente le Ct au-delà duquel nous estimons que la positivité de

l'échantillon testé ne peut pas être prise en compte. La pente de la droite permet de calculer l'efficacité de la réaction PCR. Ici, l'efficacité est de $E = 10^{(-1/\text{pente})} - 1 = 84,1\%$. Cette efficacité n'est pas idéale mais elle reste honnête pour réaliser nos expériences.

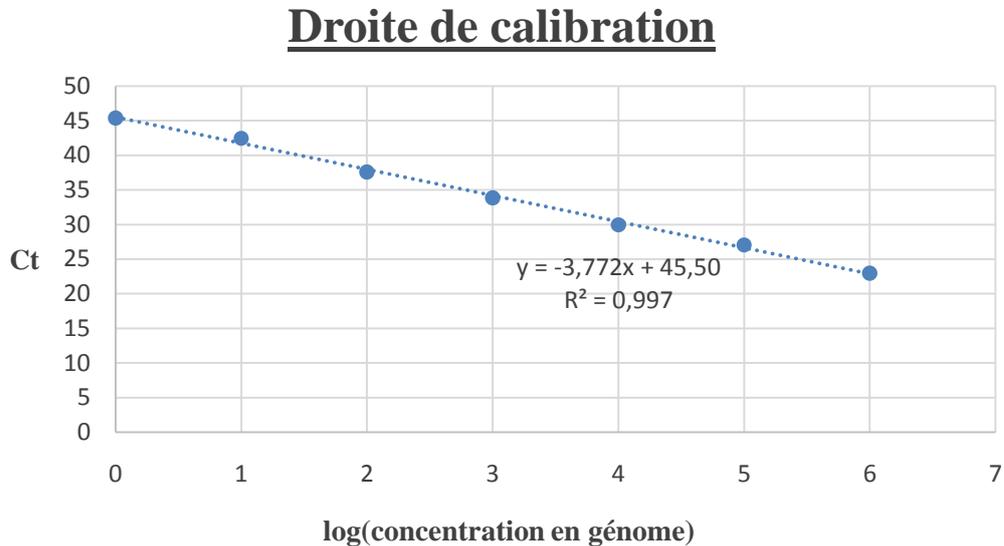


Figure 39: Droite de calibration de la RT-PCR.

Par la suite, dès qu'un échantillon sera positif, il sera possible de corréler le Ct obtenu avec une concentration en bactérie dans cet échantillon.

2.2.2. Résultats de la RT-PCR pour les 59 animaux testés

Lors de la réalisation des expériences de RT-PCR, un témoin positif et un témoin négatif (H₂O) ont été utilisés afin de vérifier l'absence de contamination lors des manipulations et le bon fonctionnement de la méthode. La solution concentrée à 10³ génomes de *Brucella ceti* B1/94 /μL constituait le témoin positif de chaque RT-PCR. Les résultats sont présentés dans le tableau 20. Le CERVA avait réalisé des PCR pour certains organes d'individus suivant le même protocole. Nous avons comparé leurs résultats, lorsqu'ils étaient présents, aux nôtres.

Tableau 20: Résultats de la RT-PCR pour des prélèvements des 60 mammifères marins testés.

| Animaux | Numéro d'autopsie | Pool d'organes testé | Résultats de la RT-PCR | Résultats du CERVA |
|--|-------------------|--------------------------|---|-------------------------------|
| M A R S O U I N S C O M M U N S | A01/803 | P / NLP / NLB | Négatif | / |
| | A02/742 | P/ NLP/ NLPul | Négatif | / |
| | A02/1285 | P / NLP / NLB | Négatif | / |
| | A03/1517 | P / NLP | Négatif | / |
| | A04/1021 | P / NLP / NLB / NLPul | Négatif | / |
| | A04/1336 | P / NLP / NLB | Négatif | / |
| | A05/1502 | P / NLB | Négatif | / |
| | A05/1824 | P / NLB | Négatif | / |
| | A05/1826 | P / NLB | Négatif | / |
| | A06/851 | P / NLB | Négatif | / |
| | A09/766 | P / NLPul | Négatif | P / NLPul: négatifs |
| | A09/1438 | P / NLB | Ct₁= 33,77 Ct_{moy}= 33,77 Soit environ 1288 génomes par µL | P / NLB /: négatifs |
| | A09/1943 | NLP | Ct₁= 35,47 Ct₂= 35,00 Ct_{moy}=35,23 Soit environ 528 génomes par µL | NLP : positifs |
| | A10/1009 | P / NLP / NLPul | Négatif | P / NLP / NLPul : négatifs |
| | A10/1279 | P / NLB | Ct₁= 32,69 Ct₂= 31,34 Ct_{moy}= 32,01 Soit environ 3770 génomes par µL | P / NLB : positifs |
| | A10/1963 | P / NLP / NLB | Négatif | / |
| | A11/1099 | P / NLP / NLB | Négatif | P / NLB: négatifs |
| | A12/371 | P / NLB | Négatif | / |
| | A12/388 | P / NLB | Négatif | / |
| | A12/484 | P / NLPul | Négatif | / |
| A12/1296 | P / NLP | Négatif | / | |
| A12/1326 | P / NLB | Négatif | / | |
| A12/1327 | P / NLB | Négatif | / | |

| | | | | |
|--|-----------------|------------------------|---|--|
| M A R S O U I N S C O M M U N S | A12/1328 | P / NLP | Négatif | / |
| | A12/1329 | P / NLB | Négatif | / |
| | A13/1002 | P / NLP / NLB | Négatif | / |
| | A13/1262 | P / NLP / NLPul | Négatif | / |
| | A13/1282 | P / NLP / NLB | Négatif | / |
| | A13/1283 | P / NLP / NLPul | Négatif | / |
| | A13/1285 | P / NLP / NLB | Négatif | / |
| | A13/1931 | P / NLP | Négatif | / |
| | A13/1932 | P / NLP | Négatif | / |
| | A13/1933 | P / NLP | Négatif | / |
| | A13/1934 | P / NLP | Négatif | / |
| | A13/1935 | P / NLP / NLB | Ct₁= 33,91 Ct₂= 30,46 Ct_{moy}= 32,19 Soit environ 3378 génomes par µL | / |
| | A13/1936 | P / NLP | Négatif | / |
| | A13/1937 | P / NLP | Négatif | / |
| | A13/1938 | P / NLP | Négatif | / |
| | A13/1939 | P / NLP / NLB | Négatif | / |
| | A14/329 | P / NLP | Négatif | / |
| | A14/348 | P / NLP | Négatif | / |
| | A14/353 | P / NLP | Négatif | / |
| A14/714 | P / NLB | Négatif | / | |
| Dauphin commun | A13/1034 | P / NLPul | Négatif | P : positif NLPul : négatif |
| Lagénorrhynque à bec blanc | A16/317 | P / NLP/ NLB /NLPul | Négatif | / |
| Globicéphales noirs | A16/310 | P / NLP / NLPul | Négatif | / |
| | A16/311 | P / NLP / NLPul | Négatif | / |
| | A16/312 | P / NLP / NLB | Négatif | / |
| Phoques veaux-marins | A08/692 | P / NLB | Négatif | / |
| | A10/1039 | P / NLP | Négatif | P / NLP : négatifs |
| | A10/1308 | P / NLB | Négatif | P / NLB : négatifs |
| | A10/1309 | P / NLPul | Négatif | / |
| | A10/1985 | P / NLP | Négatif | / |
| | A11/1102 | P / NLP | Négatif | P / NLP : négatifs |

| | | | | |
|---------------------------------|-----------------|---------------|---|--|
| Phoques veaux-marins | A12/1995 | P / NLP | Négatif | P / NLB : négatifs |
| | A13/316 | P / NLP | Ct₁= 38,46 Ct_{moy}= 38,46 Soit environ 73,5 génomés par µL | / |
| | A13/361 | P / NLP | Négatif | / |
| | A15/333 | P / NLP / NLB | Négatif | / |
| Phoque gris | A12/1999 | P | Négatif | P / NLP : négatifs NLB : positif |

P= poumon ; NLP= nœud lymphatique préscapulaire ; NLB= nœud lymphatique bronchique ; NLPul= nœud lymphatique pulmonaire ; NLM= nœud lymphatique mésentérique

En considérant les animaux pour lesquels la PCR a été positive lors de nos expériences ou au CERVA, sept prélèvements sont pris en considération. Ainsi, nous avons obtenu un taux de prévalence totale de 11,86% (7/59). En ce qui concerne les espèces, le taux de positivité était de 9,3% (4/43) pour les marsouins communs, 10% (1/10) pour les phoques veaux-marins, plus un dauphin commun et un phoque gris. Pour trois des sept animaux positifs, des RT-PCR de chaque organe composant le pool testé ont été réalisées. Tous les organes testés individuellement se sont révélés positifs. Les résultats sont détaillés dans le tableau 21.

Il est à noter que le marsouin commun A09/1438 a été testé négatif par le CERVA mais qu'il est ressorti positif lors de nos expérimentations. Enfin, pour deux des cinq marsouins positifs lors des RT-PCR menées, un des duplicatas s'avérait négatif. Ces deux sont quand même retenus positifs puisque une PCR est revenue positive.

Tableau 21: Résultats de la RT-PCR des organes testés en pool de trois mammifères marins positifs.

| Animal | Organe testé | Résultat de la RT-PCR |
|---------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| A09/1279 (marsouin) | Poumon | Ct= 34,87 |
| A09/1279 (marsouin) | Nœud lymphatique bronchique | Ct= 34,45 |
| A09/1438 (marsouin) | Poumon | Ct= 41,09 |
| A09/1438 (marsouin) | Nœud lymphatique bronchique | Ct= 38,93 |
| A13/1935 (marsouin) | Poumon | Ct= 35,43 |
| A13/1935 (marsouin) | Nœud lymphatique préscapulaire | Ct= 38,25 |
| A13/1935 (marsouin) | Nœud lymphatique bronchique | Ct= 36,98 |

Enfin, comme nous avons pu le voir dans la partie bibliographique concernant la brucellose chez les mammifères marins, la parasitose pulmonaire est souvent associée à des poumons obtenus positifs à la brucellose par diverses méthodes diagnostiques. Nous avons donc réalisé des extractions d'ADN sur les parasites des voies respiratoires du marsouin A09/1943 et du phoque gris A12/1999. Après réalisation de la RT-PCR, les deux échantillons se sont révélés négatifs. Nous n'avons pas d'échantillons des parasites des voies respiratoires pour les autres individus.

2.3. Etudes lésionnelles et immunohistochimiques des animaux positifs à *Brucella* en RT-PCR

En ce qui concerne l'étude lésionnelle et la réalisation des immunohistochimies, nous avons sélectionné 11 organes à analyser. Ces organes sont l'encéphale, le poumon, le cœur, les nœuds lymphatiques, la rate, le foie, le rein, la glande mammaire, l'utérus, l'ovaire et le testicule. Le tableau 22 détaille les organes que nous avons pu analyser parmi cette liste pour chaque animal positif en RT-PCR.

Tableau 22: Liste des organes testés par immunohistochimie pour chaque animal positif par RT-PCR.

| Animal | Organes testés |
|----------------------------|--|
| A09/1438 (marsouin commun) | Encéphale (quatre coupes) Poumon Ventricule Nœud lymphatique préscapulaire Nœud lymphatique bronchique Rate Foie Glande mammaire Utérus/ovaire |
| A09/1943 (marsouin commun) | Encéphale (cinq coupes) Poumon Ventricule gauche (deux coupes) Nœud lymphatique préscapulaire Nœud lymphatique bronchique Nœud lymphatique mésentérique Rate |

| | |
|-----------------------------|--|
| | Foie Rein Glande mammaire Utérus/ovaire |
| A10/1279 (marsouin commun) | Pas d'organes |
| A13/1935 (marsouin commun) | Poumon Nœud lymphatique préscapulaire Nœud lymphatique pulmonaire Rate Foie Rein Testicule |
| A13/1034 (dauphin commun) | Encéphale (cinq coupes) Poumon Nœud lymphatique pulmonaire Rate Foie Rein |
| A13/316 (phoque veau-marin) | Encéphale (trois coupes) Poumon Myocarde Nœud lymphatique préscapulaire Nœud lymphatique bronchique Nœud lymphatique cervical Rate Foie Rein |
| A12/1999 (phoque gris) | Poumon Rate |

Concernant le marquage immunohistochimique des *Brucella*, il a été réalisé comme décrit dans la partie 2.1 Matériel et Méthodes. Dans le cadre de cette expérience, une coupe de tissu est considérée positive lorsque le marquage est présent dans le cytoplasme des cellules, que la coloration se trouve dans le plan et que celle-ci est franche (fig.40). Le marquage est dit suspect lorsque la coloration, bien que présente dans le plan et dans le cytoplasme de cellules,

n'est pas franche. Pour toute coloration en dehors de cellules ou concernant des débris nécrotiques, le marquage est dit artificiel. Pour une coupe qui ne présente aucune coloration intracellulaire ou en dehors du plan, le résultat est dit négatif.

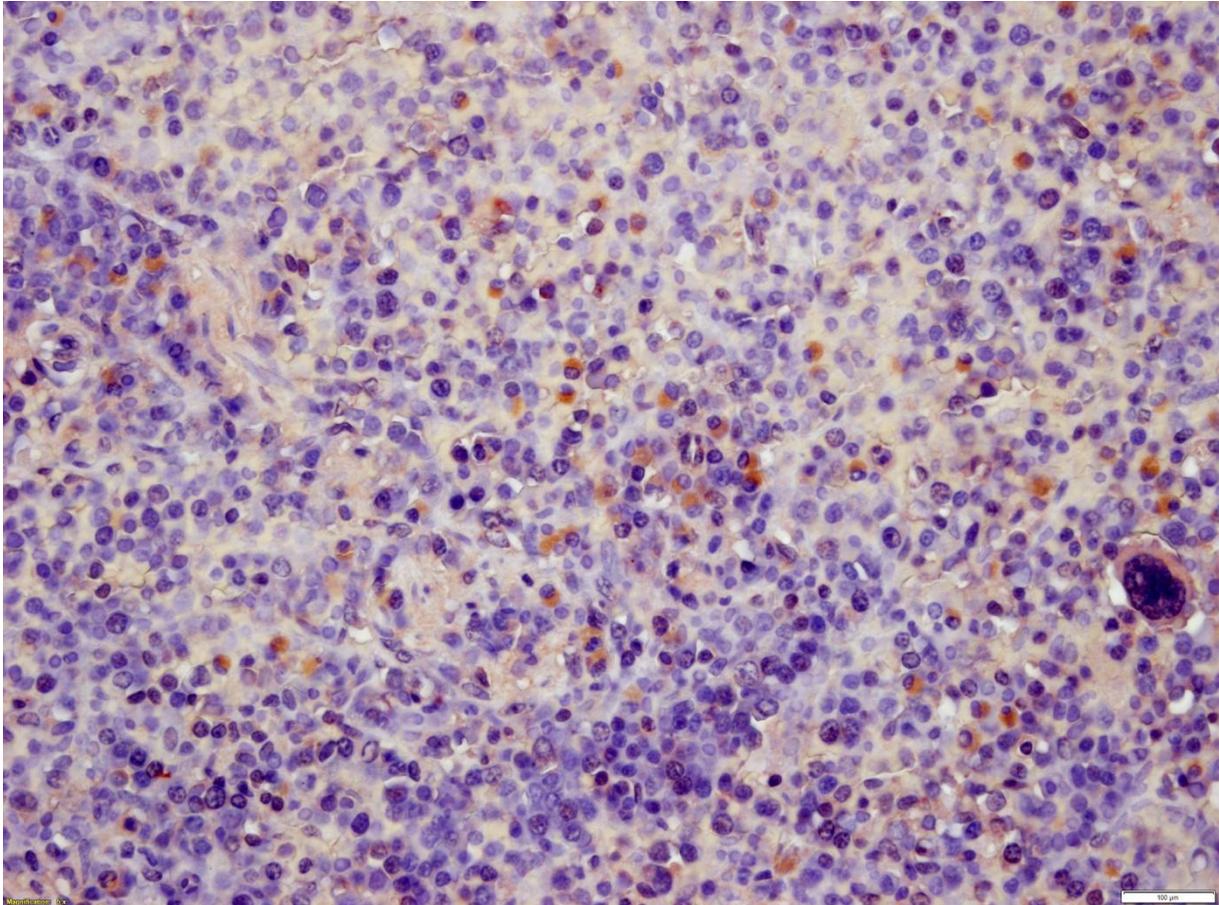


Figure 40: Coloration d'immunohistochimie sur la rate d'un marsouin échoué sur la côte belge en 2008 (témoin positif).

2.3.1. *Le marsouin commun A09/1438*

a) Rapport d'autopsie :

Ce marsouin était une femelle adulte en bon état d'embonpoint (épaisseur de lard dorsal de 24 mm) échouée le 30 Novembre 2008 sur une plage de Dunkerque. La longueur totale de l'animal était de 169 cm tandis que le poids corporel était de 55,5 kg. Le code de conservation de l'animal était de 2. A l'examen externe, l'animal présentait des empreintes de filets de 1 cm de long à l'extrémité caudale et des lacérations profondes sur le bord crânial des nageoires pectorales. Un léger hyphéma était présent. Les glandes mammaires étaient peu développées. Un liquide séro-hémorragique peu abondant s'écoulait des fentes mammaires, représentant un liquide de suffusion *post-mortem*. L'examen interne de l'abdomen a révélé

une coloration brun-verdâtre légèrement muscadée du foie évoquant une hépatite aiguë. Le premier estomac contenait peu d'otolithes et quelques cristallins de poissons et becs de céphalopodes. Le second estomac présentait un ulcère aigu de 1 cm de diamètre. En ce qui concerne le tractus reproducteur, l'ovaire gauche présentait trois *corpus albicans* et cinq follicules de 5 mm de diamètre. L'ovaire droit avait un follicule de 5 mm de diamètre. L'utérus était de taille normale. L'examen interne du thorax a mis en évidence une infestation légère du ventricule droit du cœur et des zones blanches de 1 cm de diamètre en surface de l'épicarde. Les nœuds lymphatiques bronchiques étaient hypertrophiques et congestifs. Les poumons présentaient une congestion et un œdème sévère associés à une mousse blanchâtre à sérohémostatique dans les voies respiratoires. Les vaisseaux pulmonaires et les bronches présentaient une infestation moyenne par des nématodes. En réaction à cette parasitose, des lésions de type pneumonie chronique multifocale parasitaire était présente.

Lors du retrait de la tête, des pétéchies intracrâniennes ont été notées. Le sinus pétympanique présentait une infestation parasitaire moyenne.

Cet animal était probablement décédé suite à l'œdème pulmonaire sévère consécutif à une capture accidentelle par des filets de pêche. Un processus infectieux ne pouvait cependant pas être exclu, en témoigne l'hépatite aiguë observée lors de l'autopsie.

b) Lésions anatomopathologiques :

Au microscope, le poumon présentait une pneumonie parenchymateuse subaiguë multifocale (fig.41) avec une infiltration macrophagique sévère et des zones de calcification. Une hépatite (fig.42) et une périangiocholite chroniques (beaucoup de granulocytes neutrophiles) ont pu être mises en évidence. Une douve était aussi présente sur la coupe de l'organe (fig.43). La glande mammaire s'est révélée être au repos mais une mammite subaiguë diffuse légère était présente. Les nœuds lymphatiques bronchique et pulmonaire présentaient une déplétion lymphoïde importante avec disparition des follicules.

Les lames de l'encéphale, du tractus reproducteur, de la rate, du ventricule n'ont présenté aucune lésion.

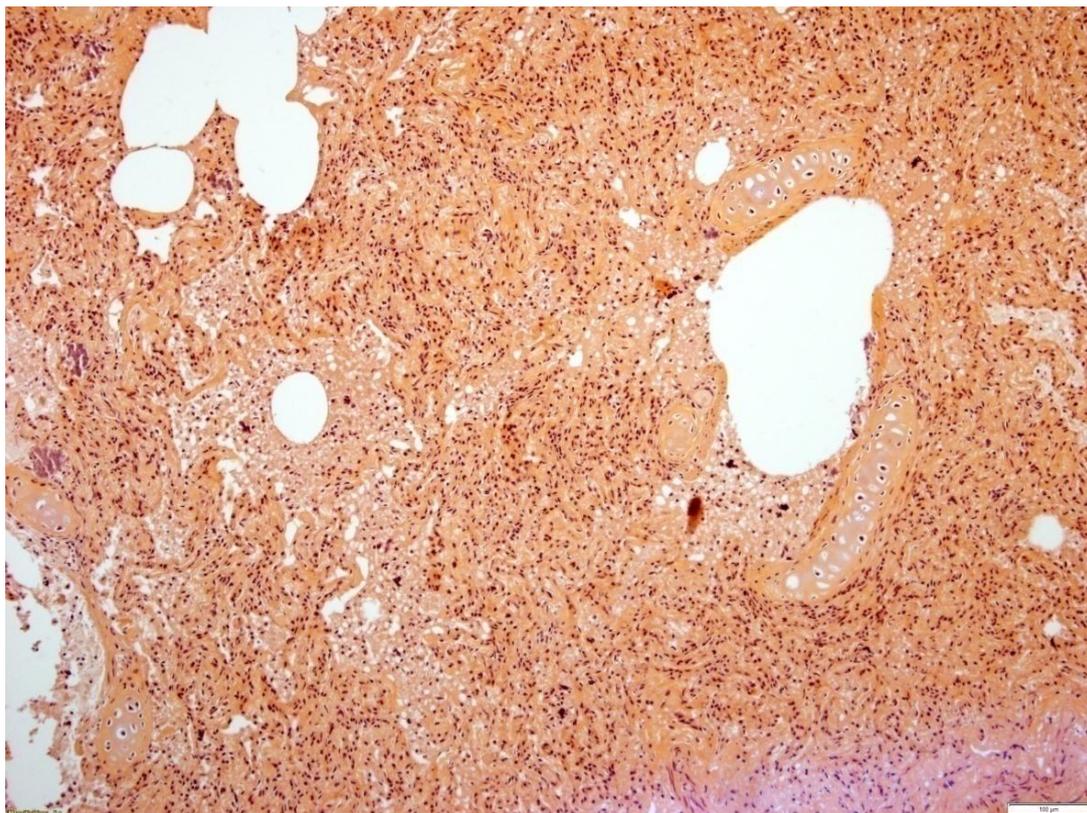


Figure 41: Pneumonie parenchymateuse subaiguë multifocale chez le marsouin A09/1438.

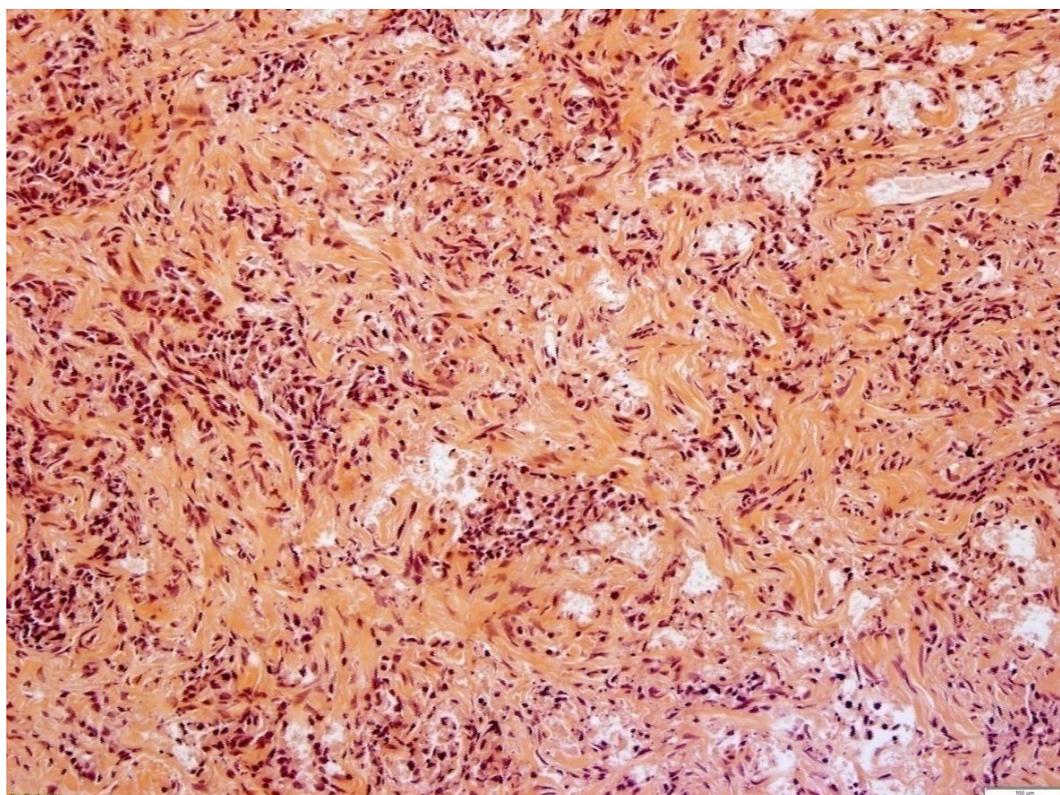


Figure 42: Hépatite chronique diffuse chez le marsouin A09/1438.

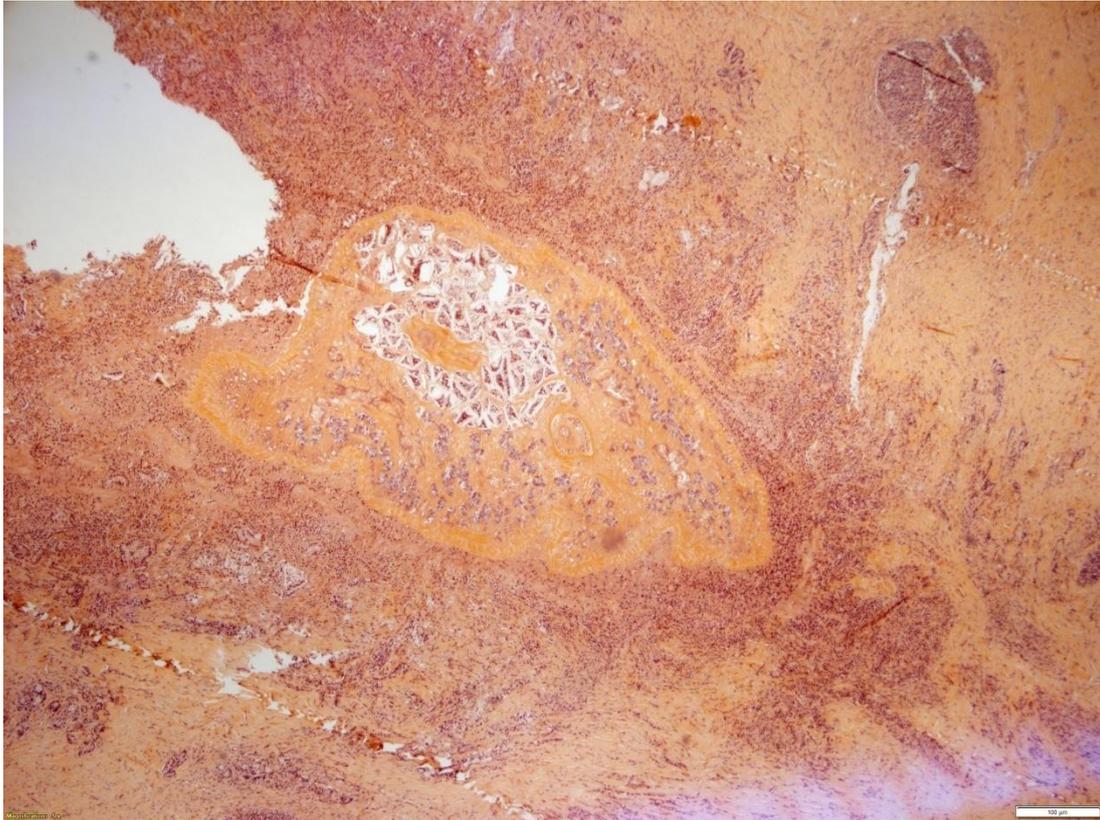


Figure 43: Parasite dans le foie chez le marsouin A09/1438.

c) Coupes immunohistochimiques :

Au total, 12 coupes ont été réalisées pour le marsouin commun A09/1438. Trois coupes d'organes se sont avérées positives : une coupe d'encéphale (fig.44), le poumon et la rate (fig.45). Deux coupes d'encéphale ont été classées comme « suspectes » et sept coupes se sont révélées négatives : une coupe d'encéphale, le tractus reproducteur, la glande mammaire, le ventricule, les nœuds lymphatiques bronchique et pulmonaire et le foie. La coloration contre *Brucella* est positive dans des cellules de type macrophages.

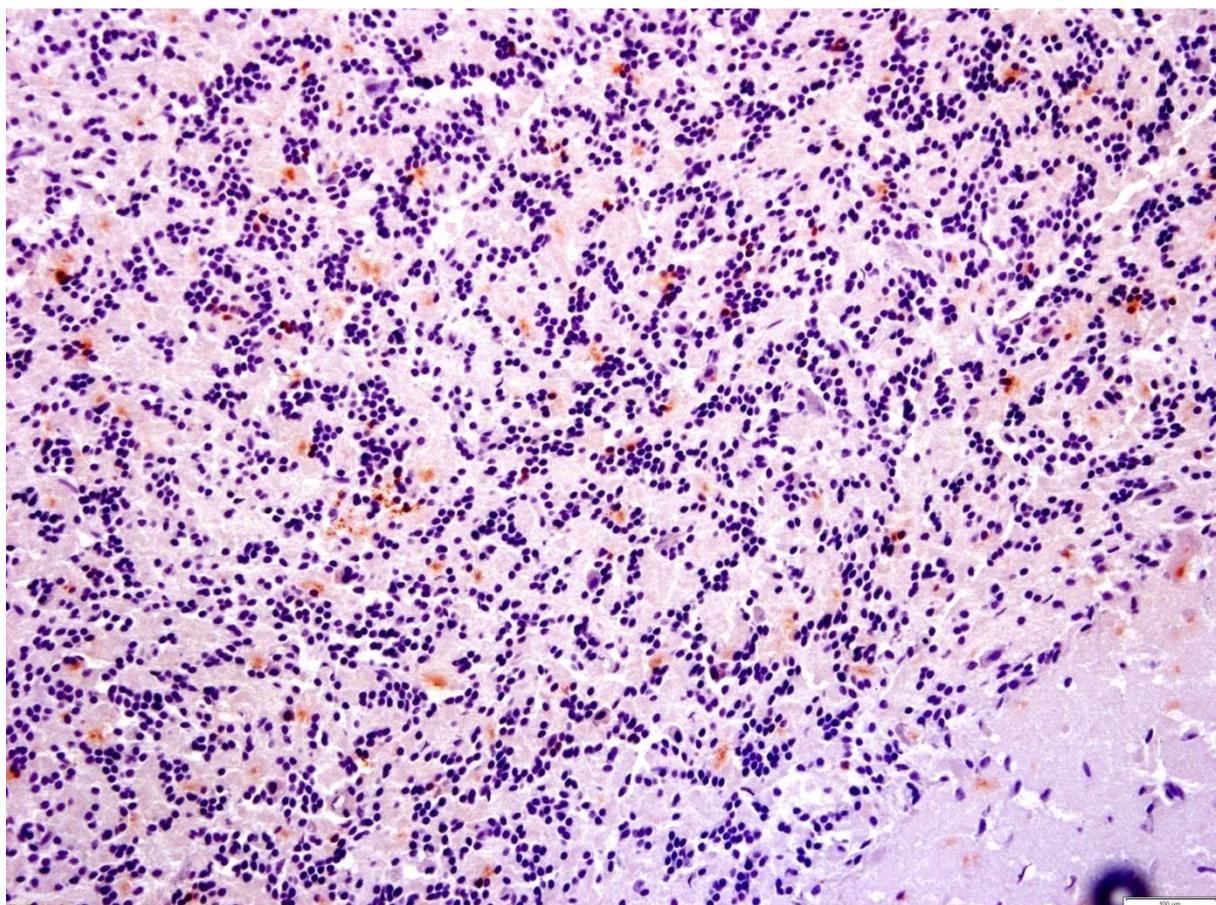


Figure 44: Coupe d'encéphale positive par immunohistochimie contre *Brucella spp.* chez le marsouin A09/1438.

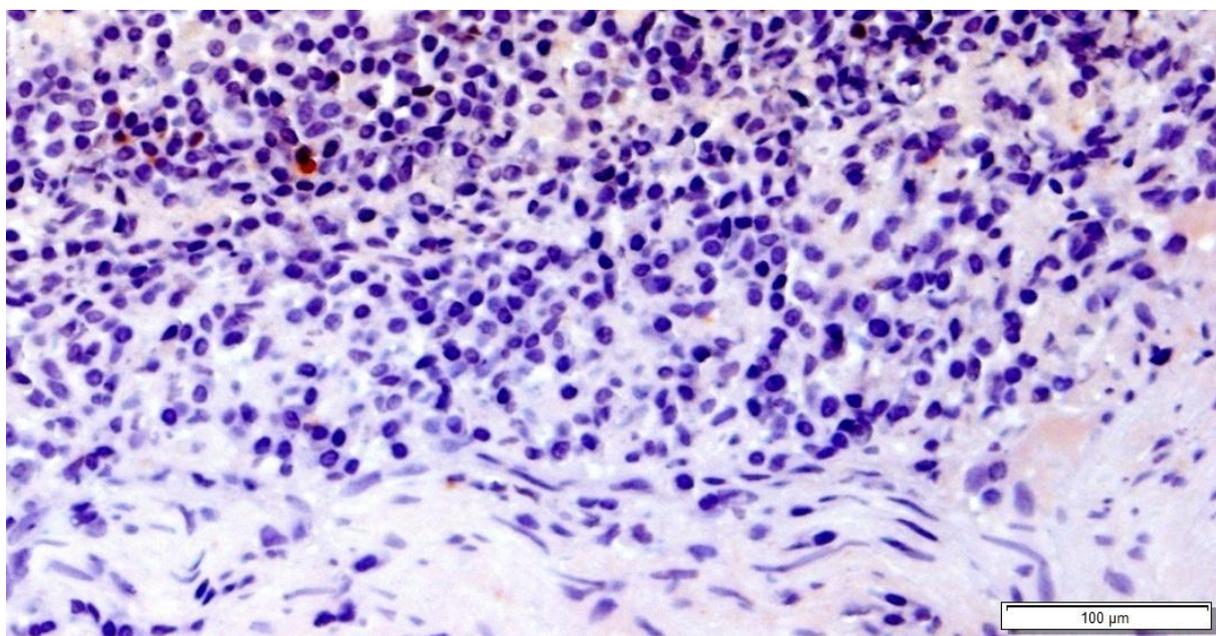


Figure 45: Coupe de rate positive par immunohistochimie contre *Brucella spp.* chez le marsouin A09/1438.

2.3.2. *Le marsouin commun A09/1943*

a) Rapport d'autopsie :

Le marsouin A09/1943 était une femelle adulte de 41kg, 148 cm, en état d'émaciation sévère (épaisseur de lard dorsal de 13 mm). Elle s'est échouée vivante à Dunkerque le 23 Septembre 2009 et présentait donc un code de conservation 1. A l'examen externe, de rares ectoparasites de type poux et des lésions de type poxvirus ont été découverts. Les muqueuses de l'animal étaient porcelaine révélant une anémie. A l'ouverture, un œdème sous-cutané et des pétéchies à l'interface du muscle et de la graisse ont été mis en évidence. Les nœuds lymphatiques préscapulaires étaient hypertrophiés. Lors de l'examen de l'abdomen, la rate et les nœuds lymphatiques étaient de taille augmentée. L'estomac était vide. Le cortex rénal était décoloré jaune-beige. Le foie était hypertrophié de couleur jaune-beige. L'ovaire gauche présentait un follicule type hémorragique de 6 mm de diamètre. L'utérus ne présentait pas d'évidence de gestation et les glandes mammaires étaient inactives. Lors de l'examen du thorax, 400 mL de liquide séro-hémorragique occupaient la cavité pleurale, représentant un hydrothorax. Tous les nœuds lymphatiques thoraciques présentaient un œdème sévère donnant un aspect gélatineux. Le thymus était aussi oedématié. Le péricarde contenait 20 mL de liquide cristallin jaune (hémopéricarde). Le cœur présentait des lésions sous forme de zone blanche de 2 cm de diamètre en surface du ventricule droit, de 3 cm de diamètre à la jonction inter-ventriculaire et de 2 cm de diamètre en surface du ventricule gauche (cardiomyopathie). Le poumon présentait des lésions de type bronchopneumonie aiguë purulente associée à une abondante mousse blanchâtre localement sérohémorragique dans les voies respiratoires. Une dizaine d'érosions en coup d'ongle parsemaient la muqueuse de l'œsophage. En ce qui concerne la tête, les bulles tympaniques avaient une infestation parasitaire moyenne et une mousse purulente coulait de l'évent en association avec des nématodes. Au niveau de l'encéphale, des pétéchies ont été observés. La graisse acoustique avait un aspect légèrement hémorragique.

En conclusion, cet animal est probablement décédé d'un processus infectieux, probablement de type septicémique.

b) Lésions anatomopathologiques :

Au microscope, l'encéphale présentait de la congestion et une encéphalite subaiguë parenchymateuse focale. Une pneumonie interstitielle subaiguë sévère (fig.46) et des plages de calcification ainsi qu'une bronchopneumonie aiguë purulente ont été mises en évidence. Les reins présentaient une congestion généralisée. Une hépatite aiguë nécrosante multifocale avec des foyers cellulonécrotiques était présente (fig.47). Le cœur révélait une myocardite subaiguë multifocale périvasculaire avec infiltrations subaiguës et des zones d'hémorragies. Le nœud lymphatique préscapulaire présentait des vacuoles et des mégacaryoblastes. Le nœud lymphatique bronchique était hypoplasie.

Le tractus reproducteur, la glande mammaire, la rate et le nœud lymphatique mésentérique ne présentaient aucune lésion.

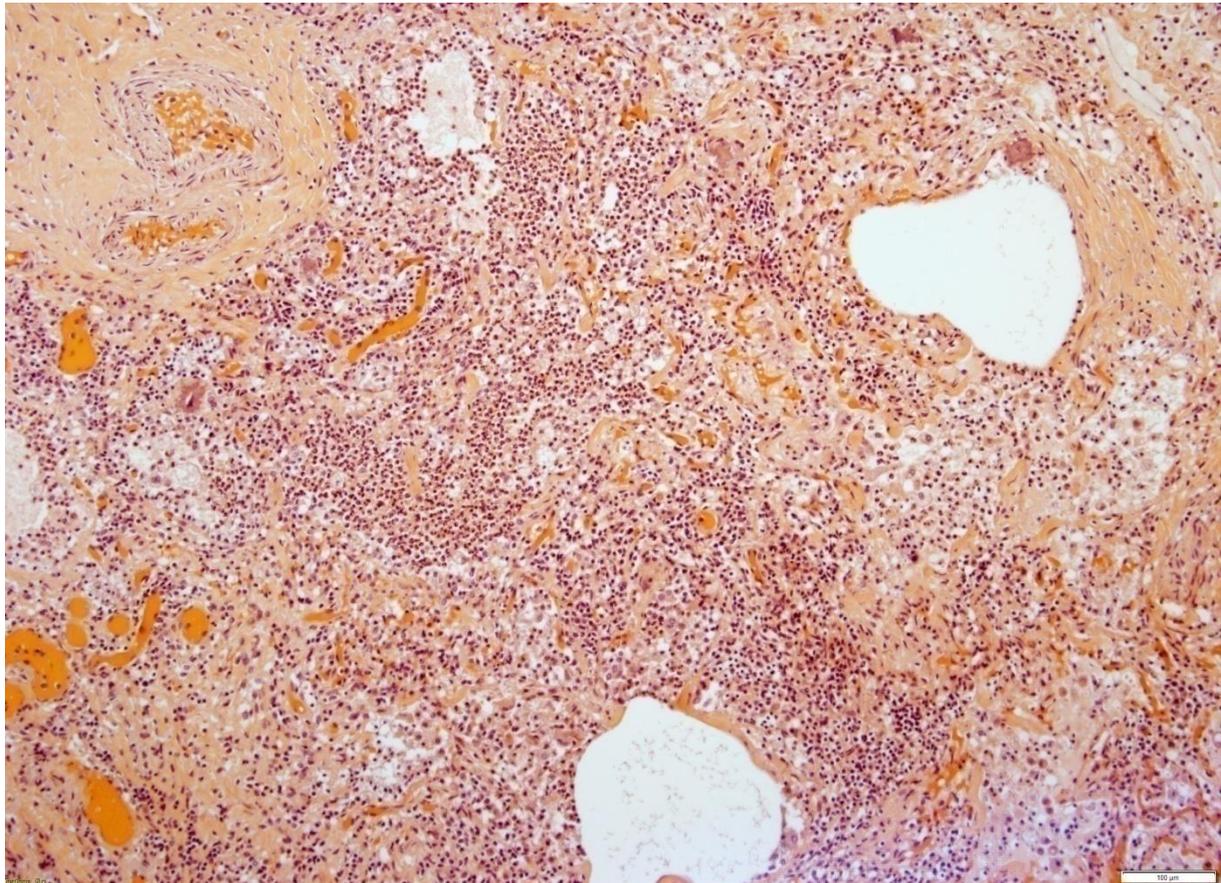


Figure 46: Pneumonie interstitielle subaiguë sévère chez le marsouin A09/1943.

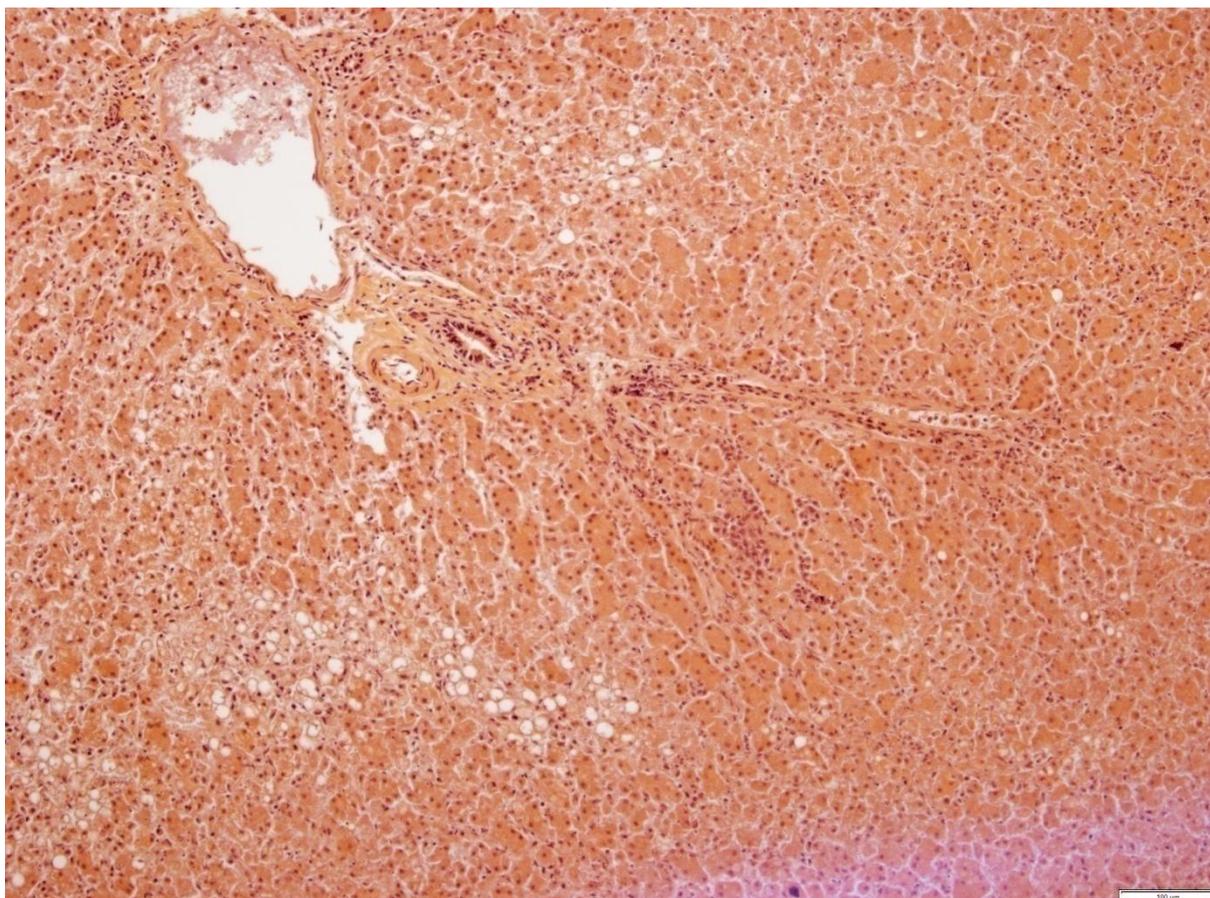


Figure 47: Hépatite aiguë nécrosante multifocale chez le marsouin A09/1943.

c) Coupes immunohistochimiques :

Au total, 16 coupes ont été réalisées pour le marsouin commun A09/1943. Cinq coupes d'organes se sont avérées positives (le poumon, la rate (fig.48), le nœud lymphatique préscapulaire (fig.49), le nœud lymphatique bronchique et le foie). Trois coupes ont été décrites comme « suspectes » : deux coupes de l'encéphale et le rein (fig.50). Huit coupes se sont avérées négatives : trois coupes d'encéphale, le tractus reproducteur, la glande mammaire, deux coupes de ventricule et le nœud lymphatique mésentérique. La coloration contre *Brucella* est positive dans des cellules de type macrophages. Le marquage se situe à la jonction entre le cortex et la médulla des nœuds lymphatiques positifs.

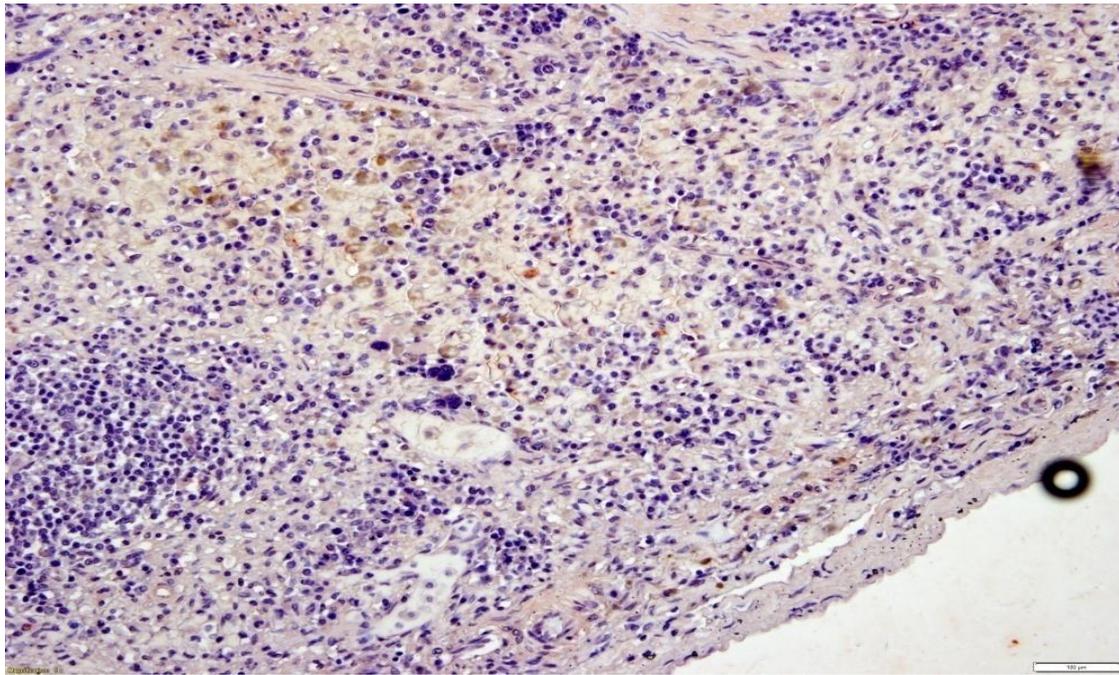


Figure 48: Coloration positive dans le cytoplasme de cellules de la rate chez le marsouin A09/1943.

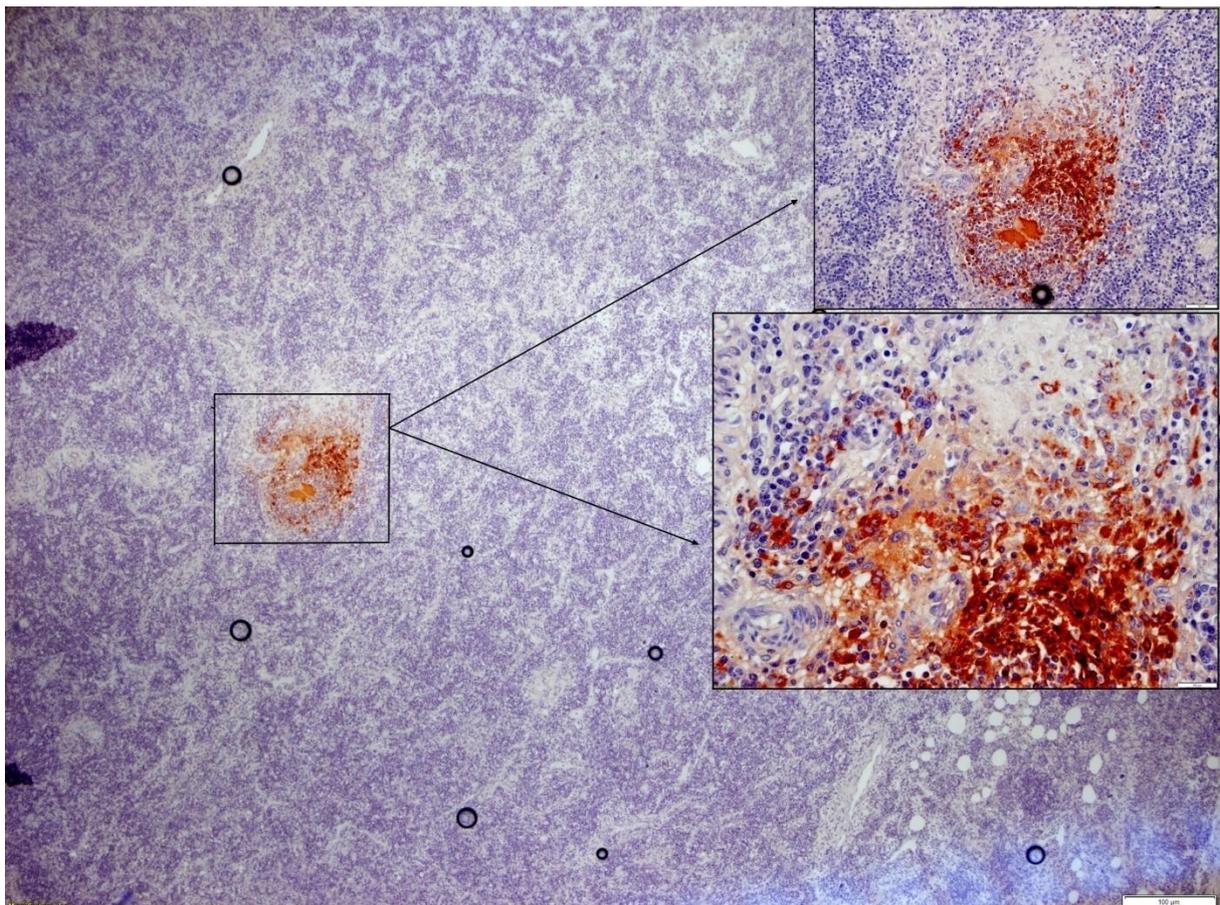


Figure 49: Coloration positive focale dans le cytoplasme des cellules inflammatoires du nœud lymphatique préscapulaire chez le marsouin A09/1943.

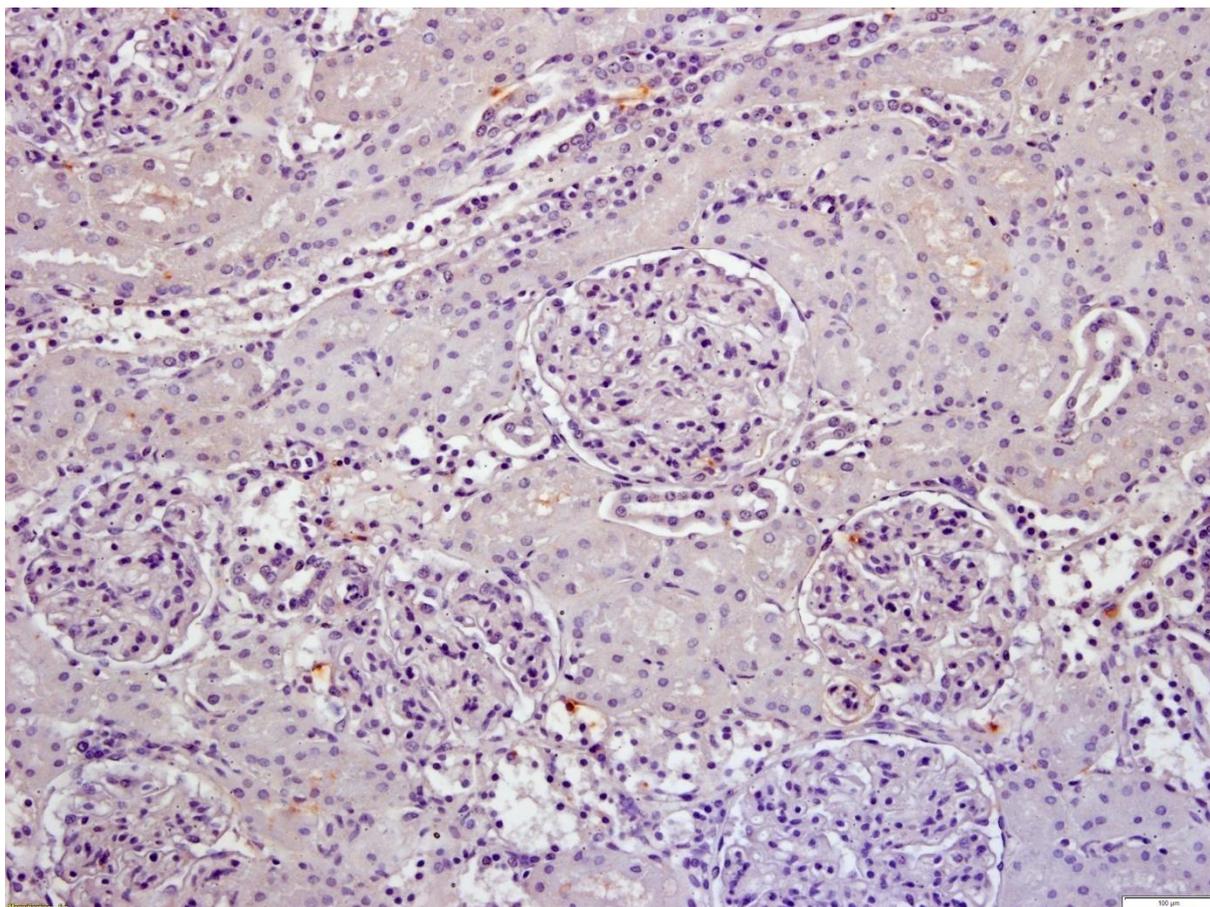


Figure 50: Coloration suspecte dans une coupe de rein chez le marsouin A09/1943.

2.3.3. *Le marsouin A10/1279 : rapport d'autopsie*

Cet animal était un mâle juvénile de 27 kg pour une longueur totale de 129 cm. Il présentait une émaciation intermédiaire (épaisseur de lard dorsal de 20 mm). Le code de conservation était de 3 donc aucun prélèvement au formol pour histologie n'a été effectué. Ainsi, pour cet animal, nous n'avons pas d'étude anatomopathologique ni immunohistochimique. A l'examen externe, l'extrémité de la nageoire pectorale gauche était tranchée. De multiples lésions de charognage étaient présentes sur la joue et le flanc gauche du marsouin. A l'examen de l'abdomen, l'estomac présentait un contenu abondant. Le second estomac avait une infestation légère par des nématodes. L'estomac 3 présentait un nodule chronique de 2 cm de diamètre à proximité du pylore dont le contenu était noir et la capsule mesurait 5 mm d'épaisseur (gastrite nodulaire chronique focale). L'examen du thorax a révélé une abondante mousse séro-hémorragique dans les voies respiratoires associée à une infestation parasitaire moyenne. L'œsophage dans sa partie thoracique était rempli d'otolithes et d'arêtes.

En conclusion, cet animal a probablement été capturé par des filets de pêche, en témoigne l'amputation partielle de la nageoire pectorale.

2.3.4. *Le marsouin commun A13/1935*

a) Rapport d'autopsie :

Cet animal était un mâle juvénile en bon état d'embonpoint (épaisseur de lard dorsal de 21 mm). Cet animal pesait 24 kg pour une longueur totale de 114 cm. Le code de conservation était de 2. Lors de l'examen externe de la carcasse, un hyphéma bilatéral a été noté. A l'ouverture, la graisse présentait des pétéchies et un hématome sous-cutané était présent à l'espace intermandibulaire. Lors de l'examen de l'abdomen, des lésions évoquant une gastrite chronique focale nodulaire parasitaire était présente. Il n'y avait pratiquement pas de contenu stomacal, seulement quelques otolithes. Lors de l'examen du thorax, les poumons présentaient une pneumonie chronique nodulaire associée à une parasitose massive des voies respiratoires ainsi que des vaisseaux pulmonaires. Des thrombi ont été notés. Les nœuds lymphatiques pulmonaires étaient congestifs et hypertrophiques.

En conclusion de l'autopsie, ce marsouin est probablement décédé d'une cause infectieuse.

b) Lésions anatomopathologiques :

Au microscope, une pneumonie granulomateuse chronique (fig.51) sévère liée à la parasitose était visible. Une déplétion lymphoïde sévère avec absence de follicules était présente dans les nœuds lymphatiques pulmonaire et préscapulaire. Le rein, la rate, le foie et le testicule n'avaient pas de lésions.

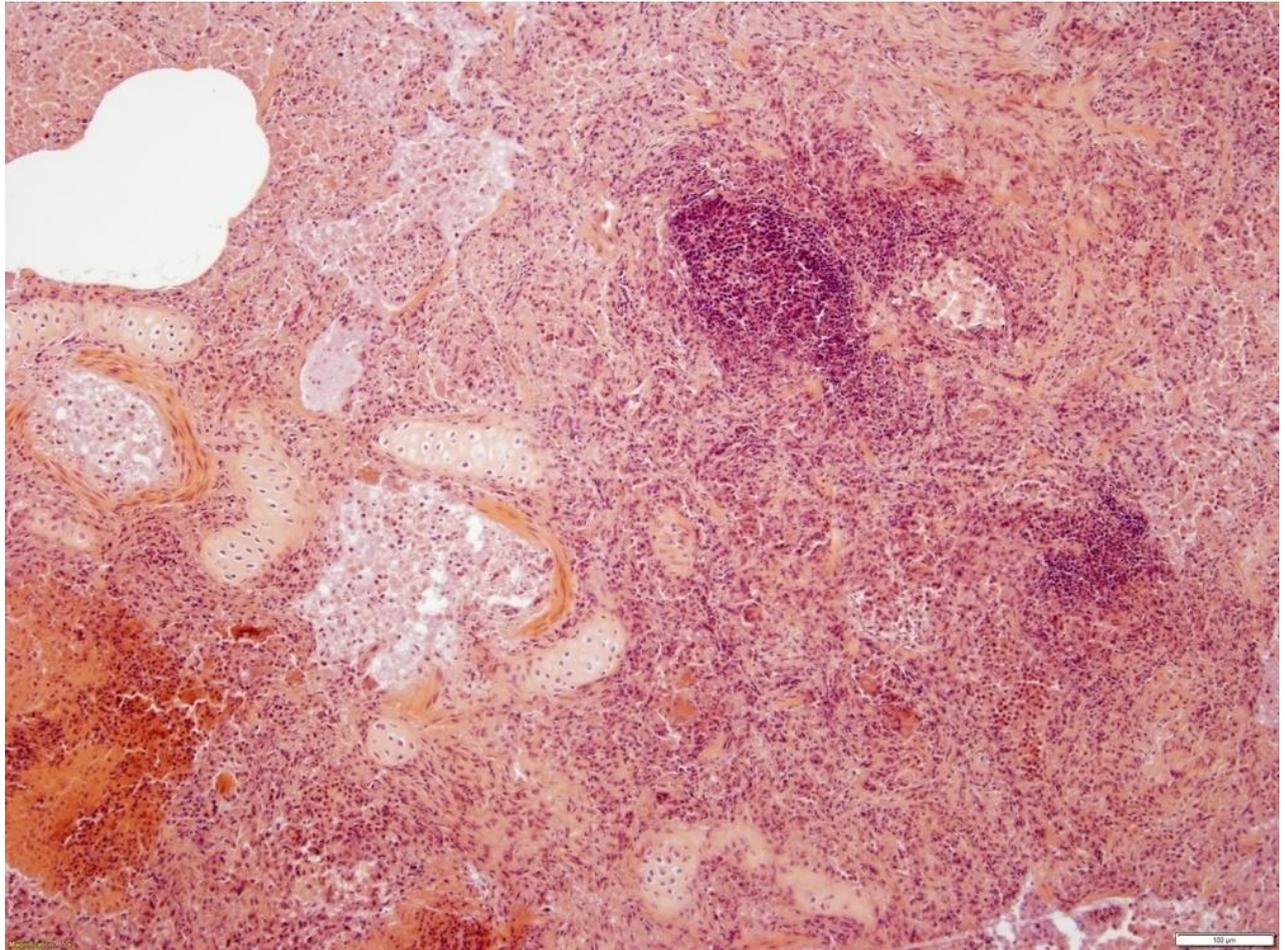


Figure 51: Pneumonie granulomateuse chronique sévère chez le marsouin A13/1935.

c) Coupes immunohistochimiques :

Au total, 7 coupes ont été réalisées pour le marsouin commun A10/1279. Deux coupes d'organe se sont avérées positives : la rate (fig.52) et le nœud lymphatique préscapulaire (fig.53). Deux coupes ont été dites « suspectes » : le poumon et le nœud lymphatique pulmonaire. Trois coupes ont été négatives : le foie, le testicule et le rein. La coloration contre *Brucella* est positive dans des cellules de type macrophages. Le marquage se situe dans la médulla du nœud lymphatique positif. De manière étrange, les anneaux cartilagineux du poumon sont marqués.

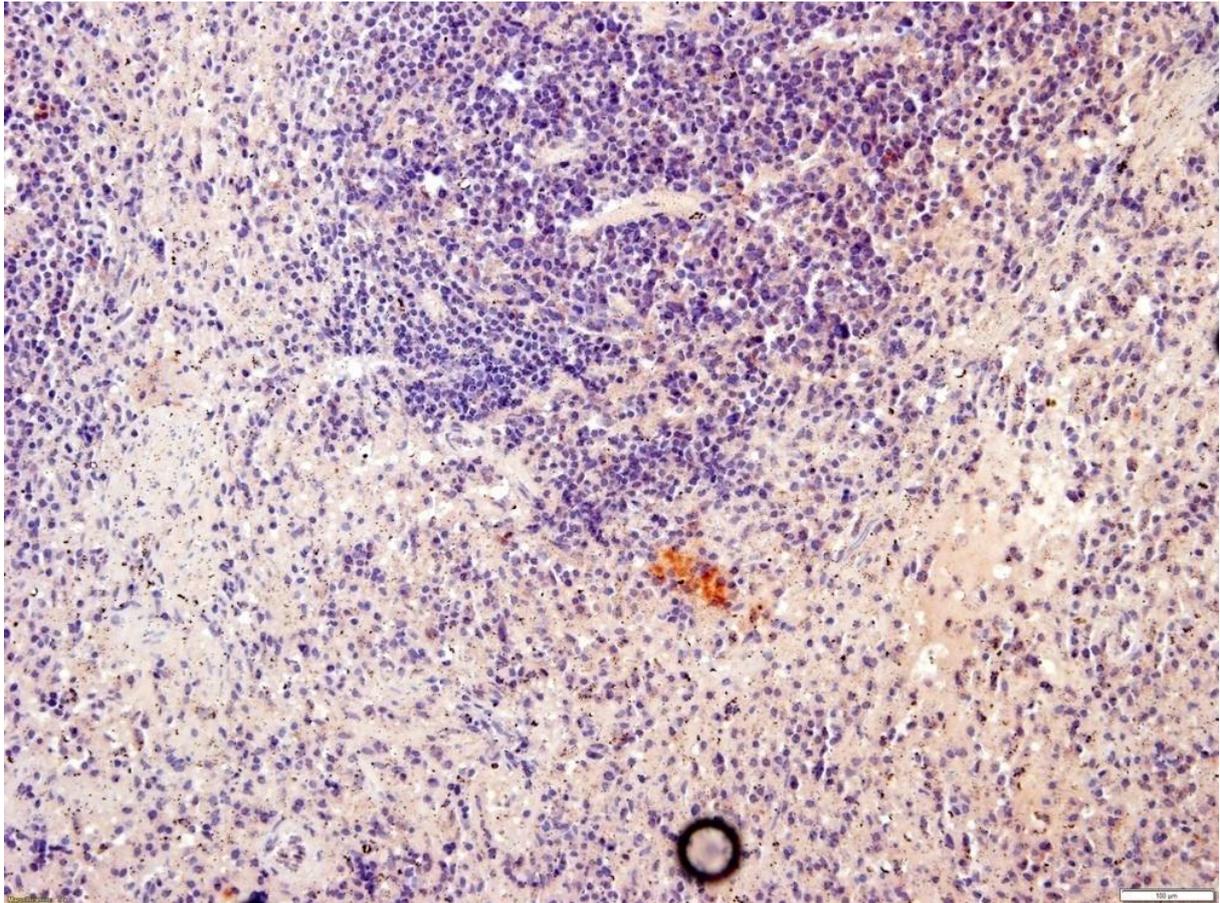


Figure 52: Coloration positive dans le cytoplasme de cellules de la rate chez le marsouin A13/1935.

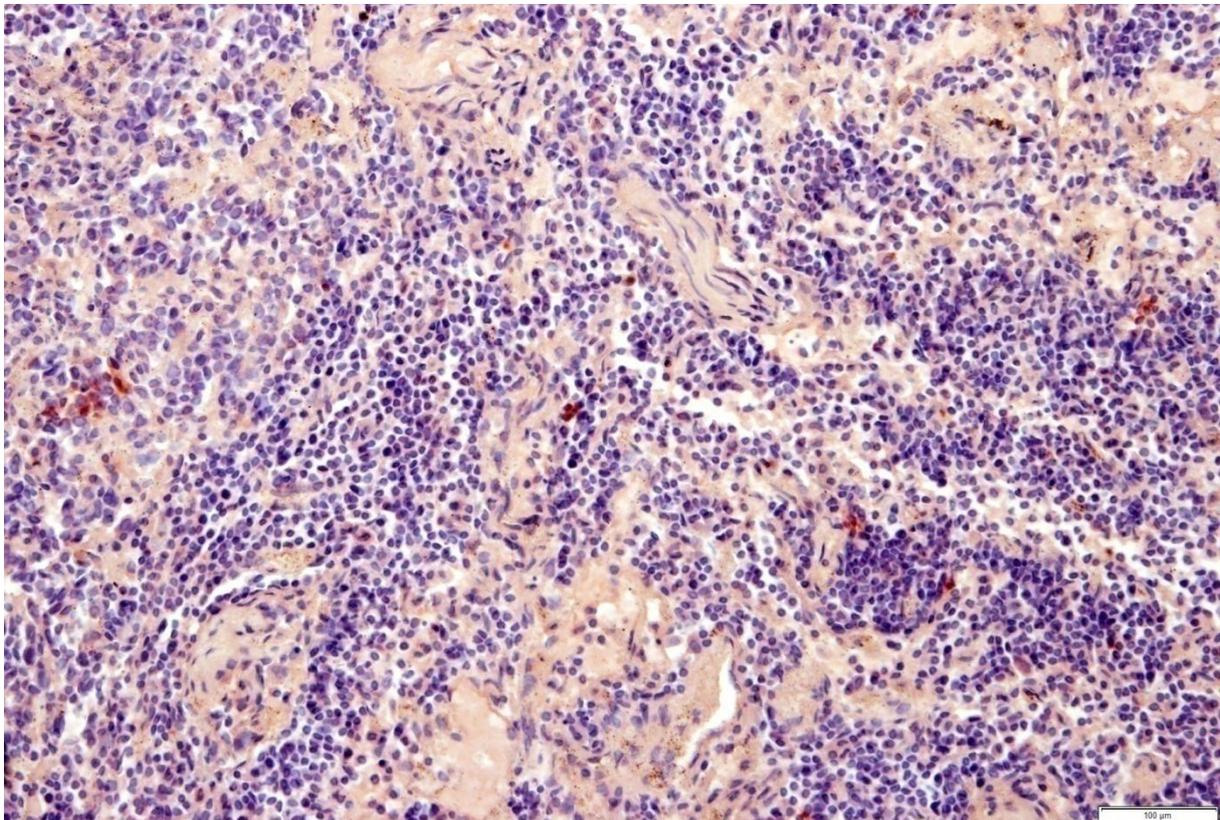


Figure 53: Coloration positive dans le cytoplasme de cellules du nœud lymphatique préscapulaire chez le marsouin A13/1935.

2.3.5. *Le dauphin commun A13/1034*

a) Rapport d'autopsie :

Un dauphin commun à bec court (*Delphinus delphis*) s'est échoué le 17 Janvier 2013 à Camiers en France. Il s'agissait d'un mâle adulte de 175 cm, de 53 kg et présentant une épaisseur de lard de 12 mm.

L'examen *post-mortem* a montré une carcasse présentant une décoloration généralisée évoquant une anémie, et une émaciation sévère. A l'examen interne, l'animal présentait des pétéchies dans le lard sous-cutané, une splénomégalie, des ulcères dans l'estomac glandulaire ainsi que des parasites et des pétéchies sur le thymus. La sphère respiratoire présentait d'importantes lésions dont une congestion et un œdème pulmonaires sévères généralisés associés à la présence de mousse blanchâtre dans les voies respiratoires. Les poumons présentaient également des lésions de type pneumonie aiguë à chronique et un emphysème. Enfin, l'examen de l'appareil génital dévoilait un micropénis (3 cm, normalement supérieure à 20 cm) et une hypoplasie des testicules (6 x 1,5 cm).

Très peu de contenu alimentaire était présent dans l'estomac, seulement quelques otolithes. La cause de la mort est très probablement d'origine infectieuse.

b) Lésions anatomopathologiques :

Au microscope, l'encéphale présentait une méningoencéphalite subaiguë périvasculaire avec épaissement et congestion des méninges (fig.54). En ce qui concerne l'appareil respiratoire, une bronchite aiguë à chronique granulomateuse parasitaire avec parfois obstruction bronchique et une bronchopneumonie aiguë purulente avec formation d'abcès ont été lus sur les lames (fig.55 et 56). Le foie présentait une hépatite portale aiguë à subaiguë. Le rein et le nœud lymphatique pulmonaire ne présentaient aucune lésion.

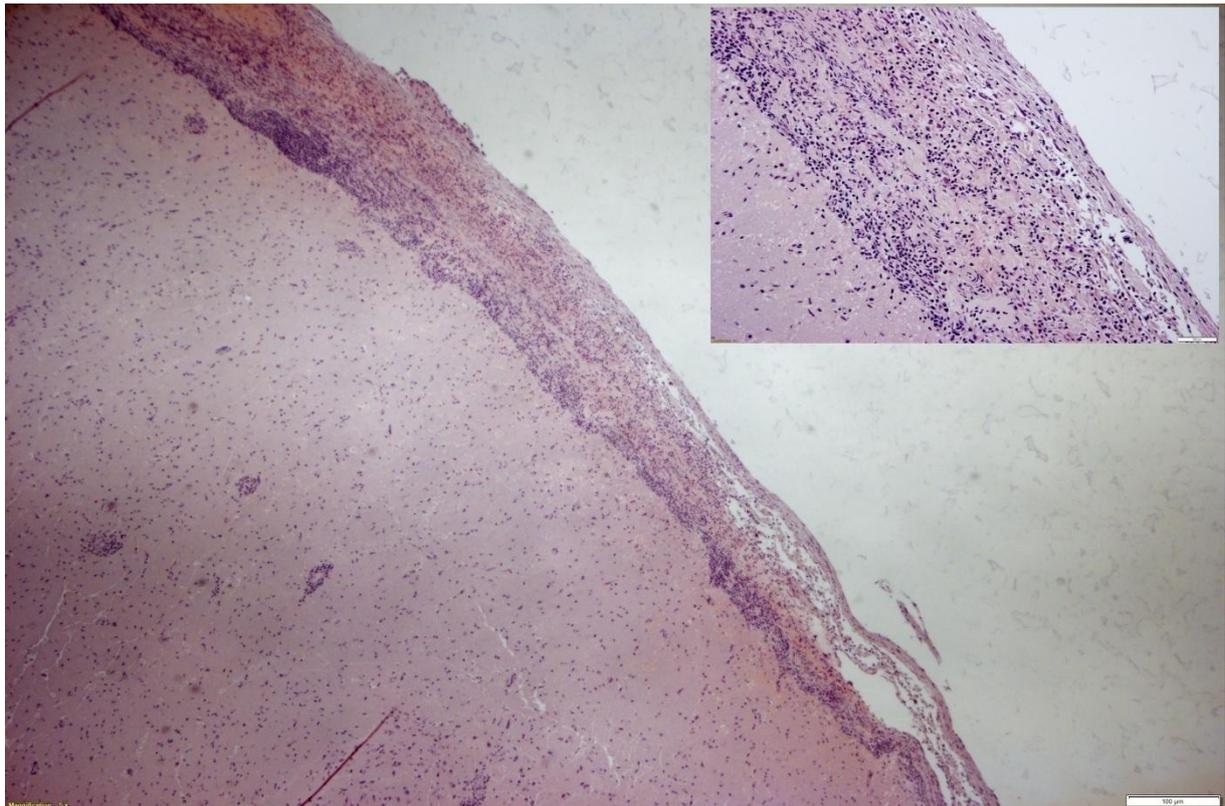


Figure 54: Méningite avec épaissement et congestion des méninges chez le dauphin A13/1034.

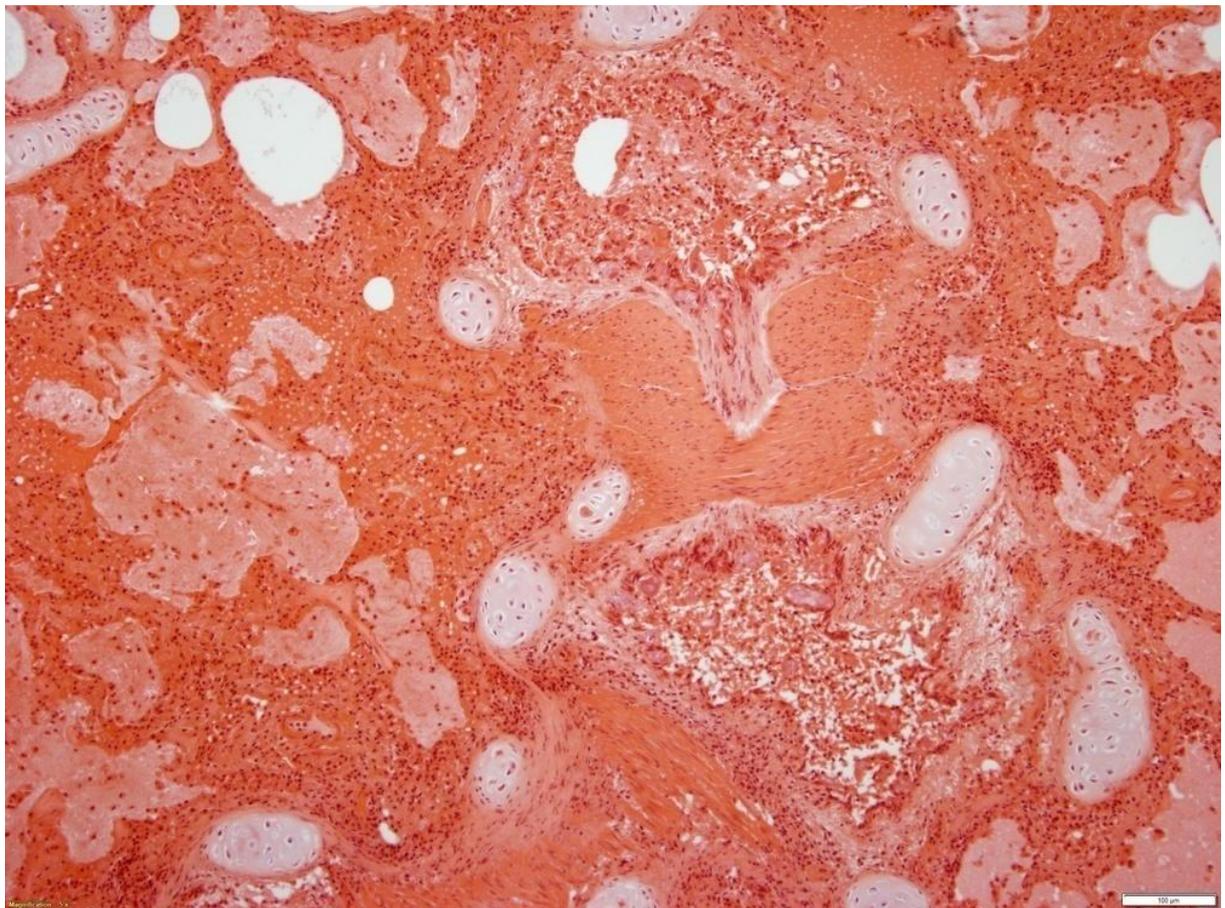


Figure 55: Bronchite aiguë à chronique granulomateuse avec parfois obstruction bronchique chez le dauphin A13/1034.

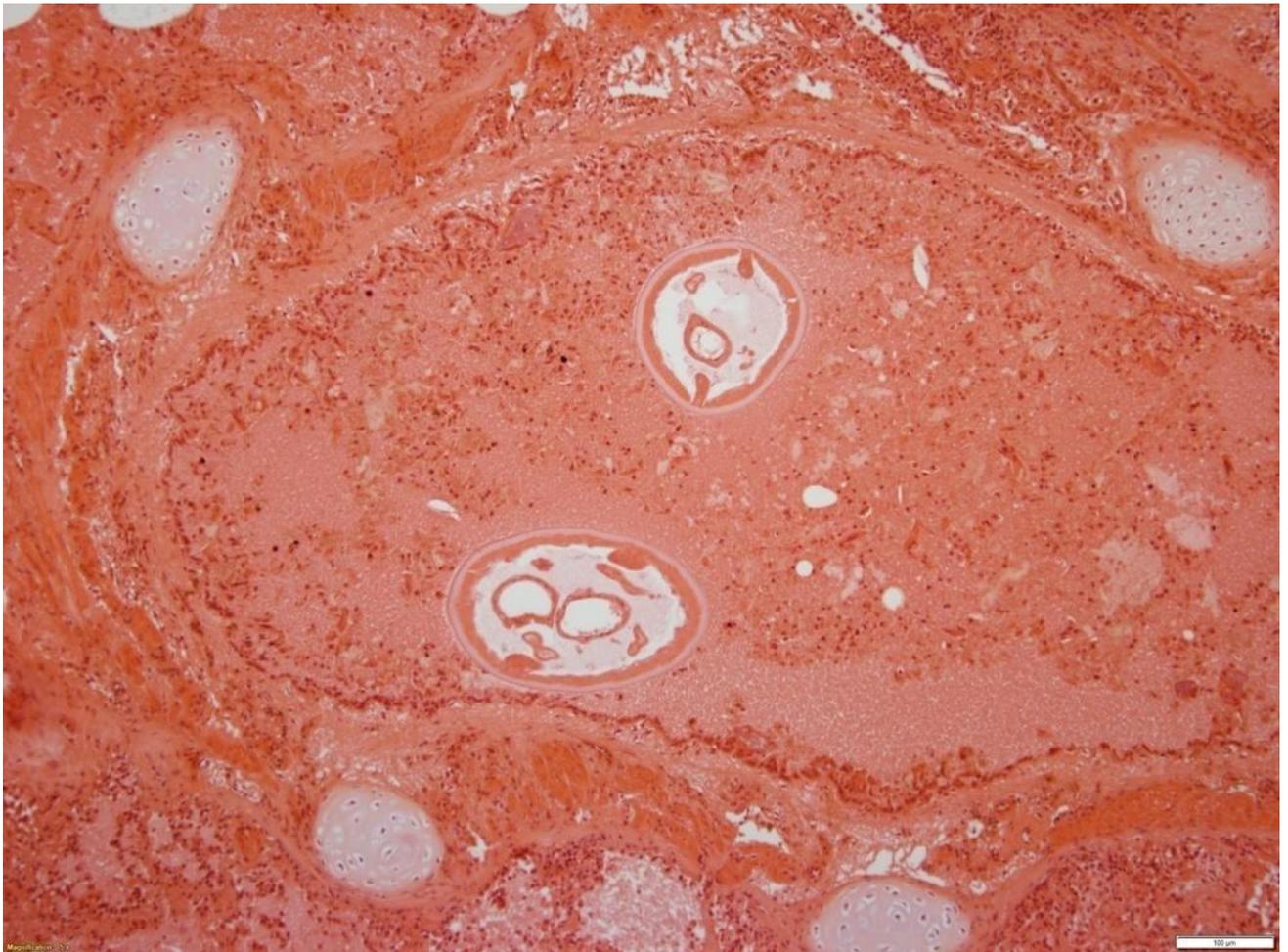


Figure 56: Larves parasitaires dans le parenchyme pulmonaire chez le dauphin A13/1034.

c) Coupes immunohistochimiques :

Au total, 10 coupes ont été réalisées pour le dauphin commun A13/1034. Trois coupes d'organe se sont avérées positives : une coupe d'encéphale (fig.57), le foie et la rate. Deux coupes ont été dites « suspectes » : une coupe d'encéphale et le nœud lymphatique pulmonaire. Cinq coupes ont été négatives : trois coupes d'encéphale, le rein et le poumon. La coloration contre *Brucella* est positive dans des cellules de type macrophages. Le poumon a été noté négatif mais la lecture de la lame était difficile puisqu'il y avait un bruit de fond assez important.

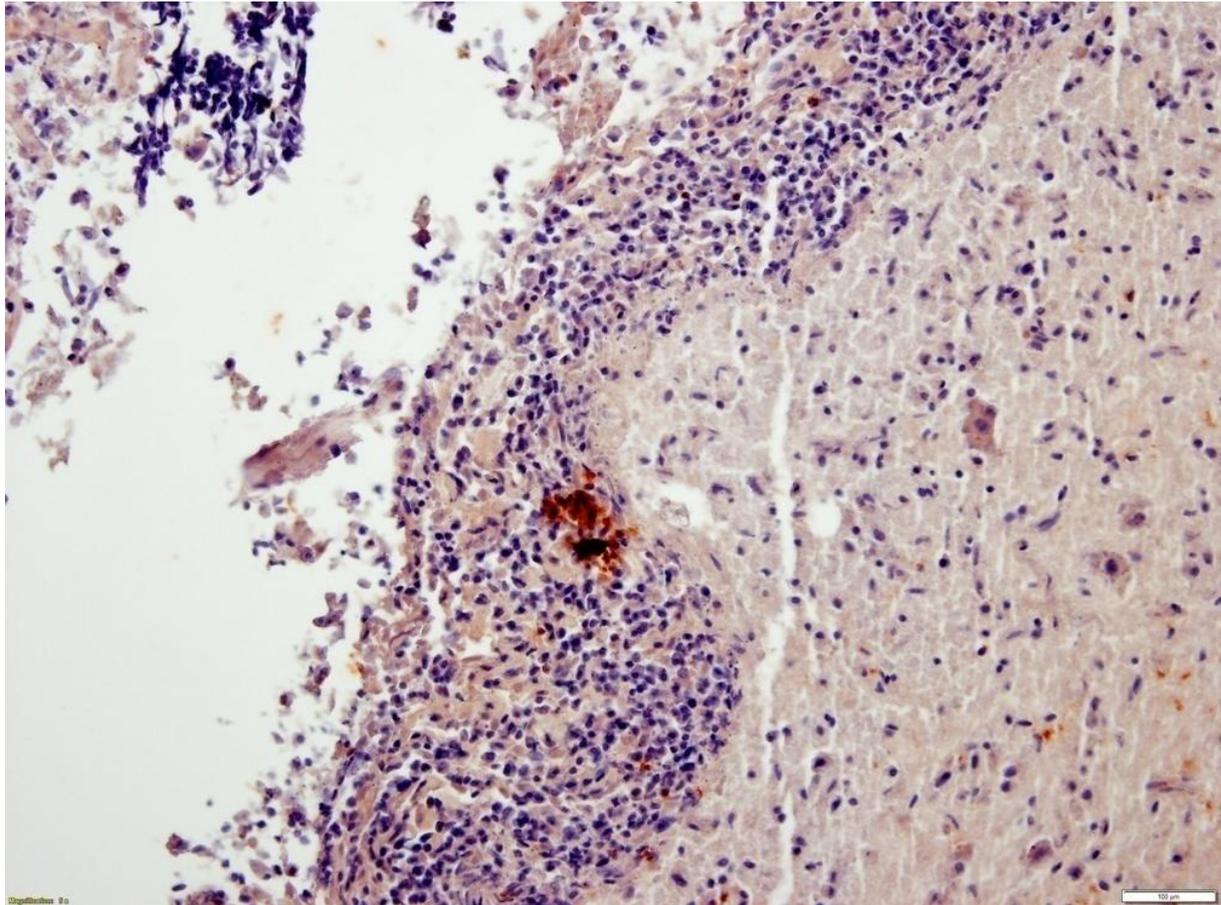


Figure 57: Coloration positive dans le cytoplasme de cellules de type macrophages dans les méninges chez le dauphin A13/1034.

2.3.6. *Le phoque veau-marin A13/316*

a) Rapport d'autopsie :

Le phoque veau-marin s'est échoué le 12 Septembre 2012 en Baie de Somme et a été euthanasié. Il s'agissait d'un mâle juvénile en état de cachexie sévère (épaisseur de lard dorsal de 10 mm, pesant 14,5 kg et de longueur totale de 97 cm). Le code de conservation de l'animal était de 1. A l'examen externe, un ulcère aigu sur la lèvre inférieure, une stomatite aiguë ulcéraire et un ulcère de 1 cm de diamètre sur la face intérieure de la palmure caudale gauche étaient présents. Les muqueuses étaient pâles, évoquant une anémie. Il y avait du jetage séro-purulent bilatéral provenant des narines. A l'ouverture, un œdème sous-cutané du cou était présent et des pétéchies sous-cutanées. Dans la zone du cou, il y avait un abcès sous-cutané ainsi qu'un phlegmon impliquant le tissu sous-cutané et le tronc musculaire et s'étendant jusqu'à sous la scapula gauche. Une décoloration évoquant une myosite et une panniculite est associée à ce phlegmon. Les nœuds lymphatiques préscapulaire gauche, cervical gauche et rétro-mandibulaire gauche sont hypertrophiés, oedématisés et congestifs.

Lors de l'examen de l'abdomen, le foie est apparu décoloré, l'estomac était vide et tubulaire et l'urine surcolorée. Lors de l'examen du thorax, des pétéchies étaient présents en surface des gros troncs cardiaques et des ecchymoses se situaient en surface de l'œsophage. Les nœuds lymphatiques thoraciques étaient hypertrophiques. Les poumons présentaient des lésions évoquant une pneumonie aiguë hémorragique associée à une mousse séro-hémorragique légèrement purulente. A l'ouverture de la boîte crânienne, une congestion méningée sévère a été observée.

Cet animal est donc décédé suite à son euthanasie. Une maladie infectieuse ayant provoquée une septicémie (*e.g.* pétéchies) est sûrement à l'origine son échouage.

b) Lésions anatomopathologiques :

Au microscope, l'encéphale présentait une gliose généralisée. Le poumon était congestif, hémorragique avec présence d'une pneumonie interstitielle subaiguë sévère et une bronchopneumonie (fig.58). Le foie présentait une dégénérescence vasculaire, de la congestion et une hémorragie focale. Une glomérulo-tubulonéphrite interstitielle subaiguë associée à une dégénérescence tubulaire et des infarcti a été notée dans le rein. La rate hébergeait de nombreux mégacaryoblastes. Les nœuds lymphatiques préscapulaire, bronchique et cervical (fig.59) présentaient un œdème et une absence de différenciation. Le testicule ne présentait pas de lésion.

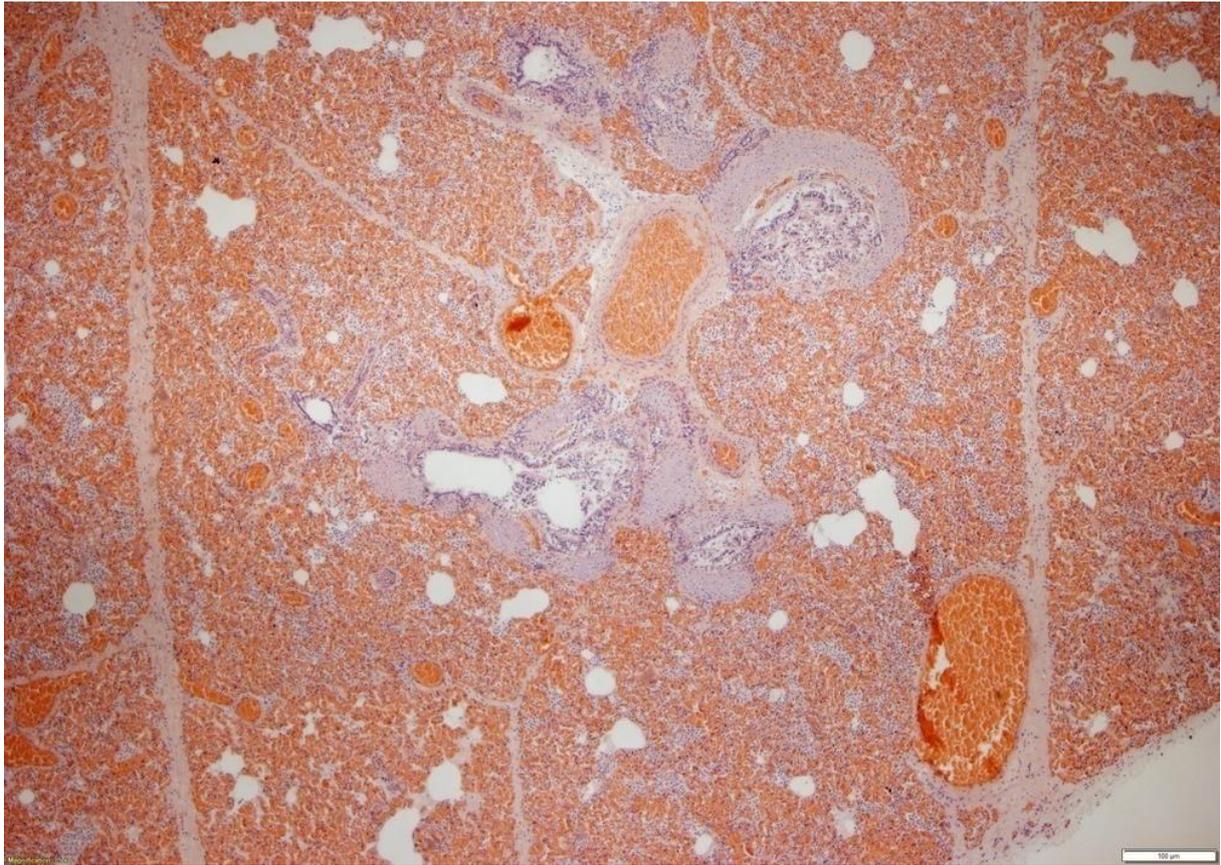


Figure 58: Poumon congestif, hémorragique et bronchopneumonie chez le phoque A13/316.

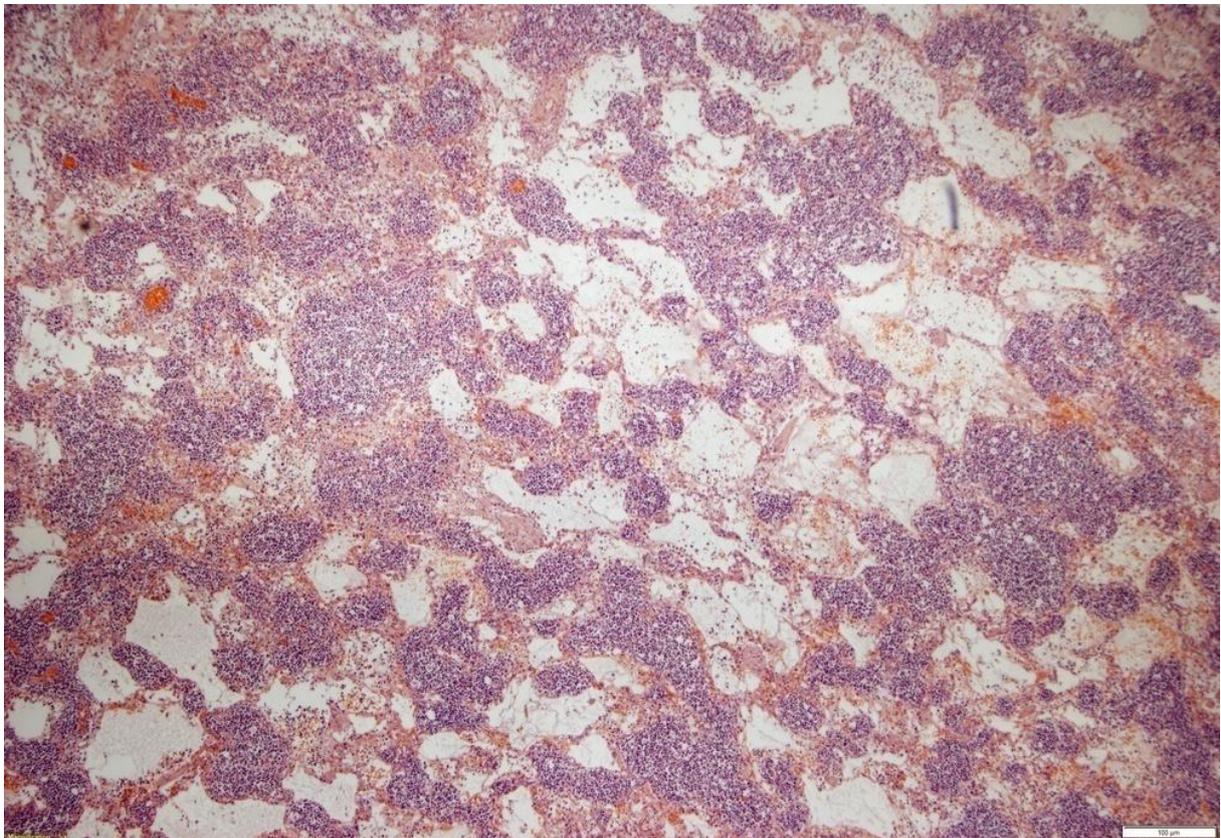


Figure 59: Nœud lymphatique cervical oedématié et non différencié chez le phoque A13/316.

c) Coupes immunohistochimiques :

Au total, 12 coupes ont été réalisées pour le phoque veau-marin A13/316. Quatre coupes d'organes se sont avérées positives : une coupe d'encéphale, la rate, les nœuds lymphatiques préscapulaire et bronchique (fig.60 et 61). Trois coupes ont été dites « suspectes » : une coupe d'encéphale, le testicule (fig.62) et le nœud lymphatique cervical. Cinq coupes se sont révélées négatives : une coupe d'encéphale, le rein, le poumon, le foie et le myocarde. La coloration contre *Brucella* est positive dans des cellules de type macrophages. Le marquage était présent dans le cortex et la médulla pour les nœuds lymphatiques positifs.

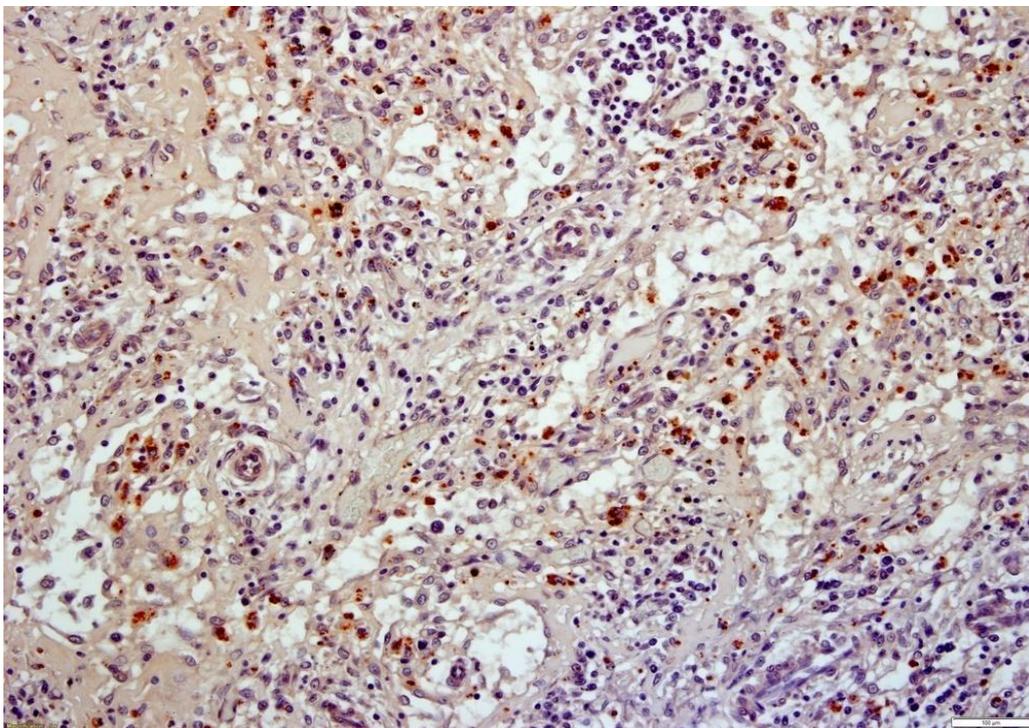


Figure 60: Coloration positive de cellules de type macrophages dans le nœud lymphatique bronchique chez le phoque A13/316.

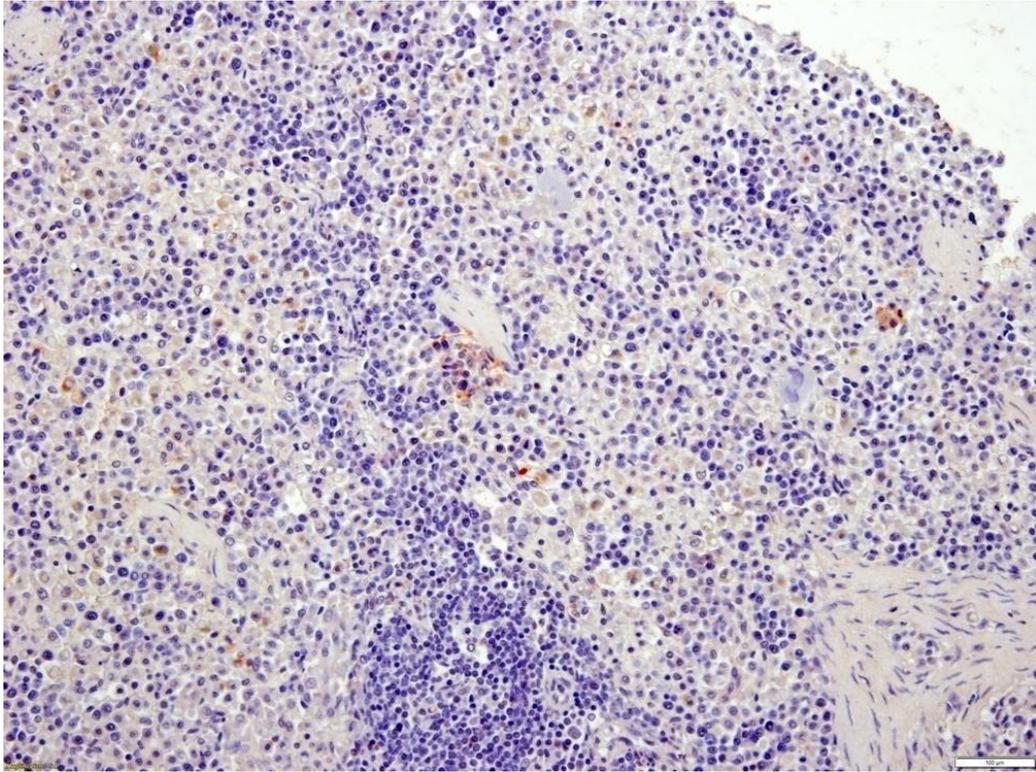


Figure 61: Coloration positive de cellules de type macrophages dans le nœud lymphatique bronchique chez le phoque A13/316.

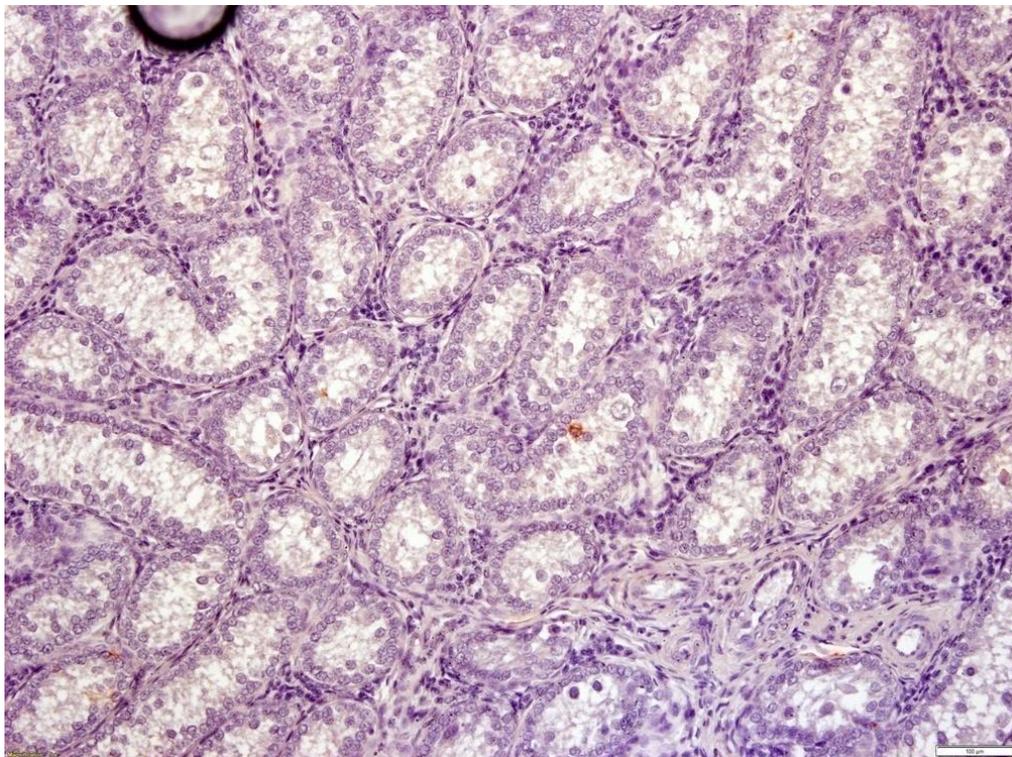


Figure 62: Coloration suspecte dans une coupe du testicule chez le phoque A13/316.

2.3.7. *Le phoque gris A12/1999*

a) Rapport d'autopsie :

Le phoque gris était un mâle juvénile de 114 cm, pesant 19,7 kg. L'animal s'est échoué en 2012 et présentait un code de conservation de 2. A l'autopsie, il a été noté une émaciation sévère révélée entre autres par une épaisseur de lard dorsal de 9 mm. A l'examen externe, des acariens (*Halarachnidae*) ont été retirés des narines. Lors de l'examen de l'abdomen, l'estomac présentait un contenu alimentaire récent et abondant. Lors de l'examen des poumons, des lésions de type pneumonie aiguë a été notée ainsi que des parasites dans les voies respiratoires. La pneumonie et la parasitose suggèrent une mort suite à un processus infectieux ; l'émaciation sévère étant la conséquence de la maladie et de l'affaiblissement de l'animal.

b) Lésions anatomopathologiques :

Au microscope, seuls deux organes étaient disponibles, le poumon et la rate. L'observation n'a apporté aucune conclusion puisque l'histolyse était trop importante, accompagnée de précipitations de protéines.

c) Coupes immunohistochimiques :

A la limite de l'interprétation à cause de l'histolyse importante, le poumon et la rate se sont avérés négatifs.

2.4. Séquençage de Sanger

En parallèle de l'analyse immunohistochimique d'organes des individus détectés positifs en RT-PCR (entre nos mains et/ou au CERVA), nous avons également réalisé des PCR classiques visant à amplifier certains gènes conservés chez *Brucella* suivies d'un séquençage SANGER des fragments obtenus.

La méthode de Sanger consiste à placer dans quatre tubes distincts, des brins d'ADN cibles dénaturés en grand nombre, une amorce (sur laquelle se fixe la polymérase), la polymérase elle-même et des nucléotides (dATP, dTTP, dCTP, dGTP). On ajoute ensuite un nucléotide modifié ou didésydronucléotide (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) de type différent dans chaque tube. Ceux-ci sont identiques aux nucléotides classiques à la différence

qu'il leur manque un groupement-HO nécessaire à l'assimilation du nucléotide suivant par la polymérase (liaison phospho-diester). La quantité de nucléotides modifiés incorporés dans chaque tube est bien inférieure au nombre de nucléotides classiques afin de ne pas stopper l'élongation trop tôt. Ainsi, lors de l'ajout au hasard d'un de ces nucléotides par la polymérase, la réplication du brin est stoppée. Une fois les réactions terminées, on obtient dans chacun des quatre tubes des doubles brins d'ADN de tailles variables, en fonction de leur arrêt par les nucléotides modifiés. On place alors le contenu des tubes dans quatre puits distincts (correspondant aux quatre nucléotides possibles) de gel d'électrophorèse. Après leurs migrations, dans ce gel on peut aisément retrouver l'ordre des nucléotides de la séquence concernée. Une simple lecture horizontale de ce gel (une fois révélé) permet de connaître l'ordre des bases de la séquence. Afin de voir les fragments d'ADN sur le gel d'électrophorèse, on utilise la plupart du temps des marqueurs fluorescents (Sanger *et al.*, 1977).

2.4.1. *PCR classique*

Pour la PCR classique, nous avons amplifié des fragments de deux gènes conservés au sein du genre *Brucella* : une partie du gène *bcs31* (151 pb) et une partie du gène *omp25* (523 pb). Pour chaque individu et chaque PCR, nous avons réalisé l'expérience en double.

En ce qui concerne l'amplification de la partie du gène *bcs31*, quatre animaux positifs par RT-PCR sur les sept initialement positifs par RT-PCR, sont ressortis positifs par cette méthode. Ces animaux sont trois marsouins, le A09/1943 le A10/1279 et le A13/1935 et le phoque commun A13/316. Ces mêmes quatre prélèvements des mammifères marins sont ressortis positifs pour la partie le gène *omp25*.

De manière étonnante, le marsouin A09/1438 n'a jamais été positif en PCR classique, et ce malgré une RT-PCR et une immunohistochimie positives.

Concernant le phoque A13/316, les profils de migration sur gel ont présenté de nombreuses bandes parasites en comparaison avec les autres migrations (fig.63, A et B). Pour cela, nous avons décidé de réitérer les manipulations (fig.63, C). De nombreuses bandes parasites étaient encore présentes, signe que les amorces se sont fixées non spécifiquement sur plusieurs régions de l'ADN.

Enfin, pour le phoque gris A12/1999 et le dauphin commun A13/1034, qui présentaient une recherche RT-PCR négative entre nos mains mais positive au CERVA, les PCR se sont révélées négatives.

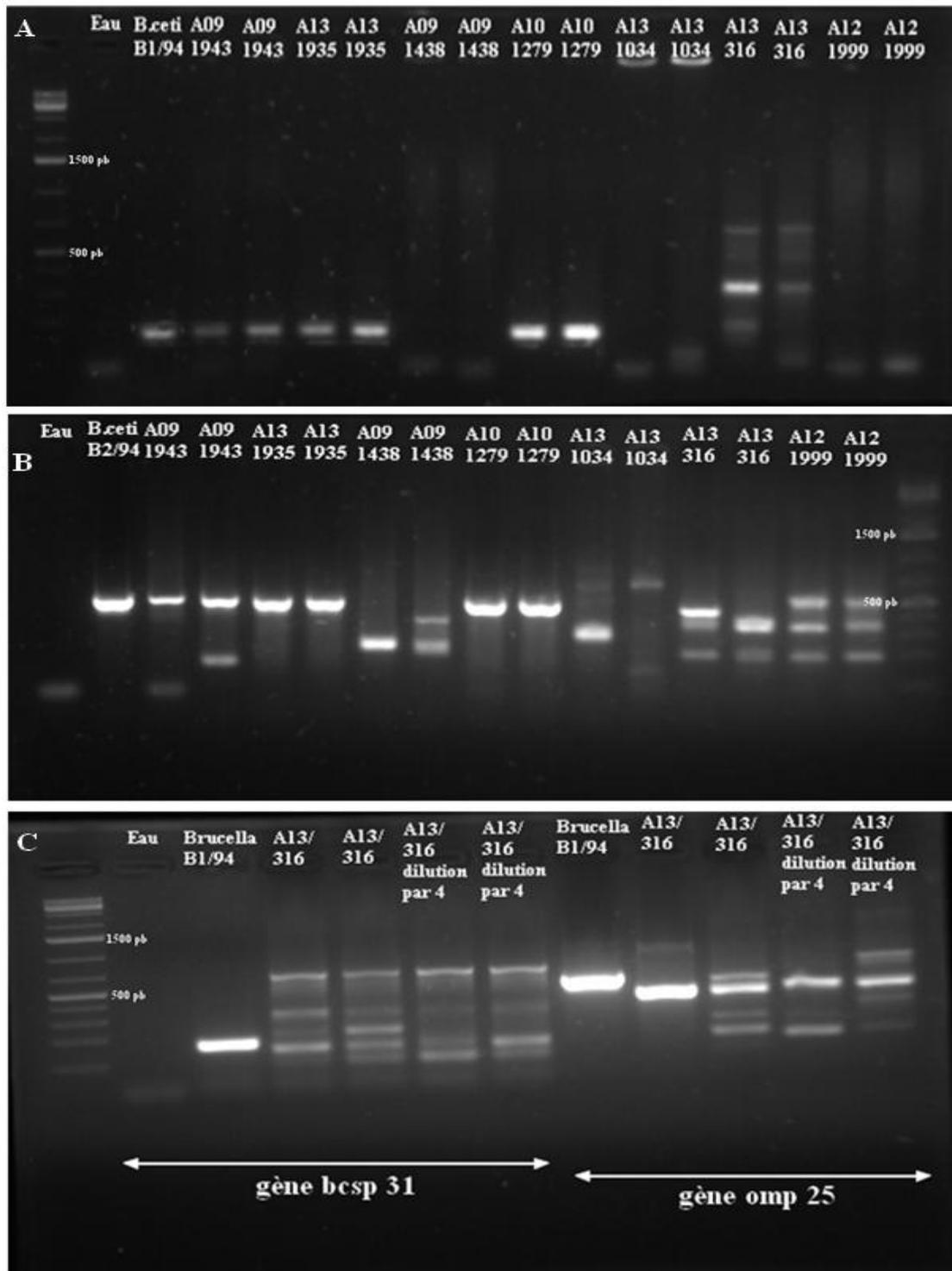


Figure 63: Résultat de la PCR de la partie du gène *bosp 31* (A), de la partie du gène *omp 25* (B) et résultats pour le phoque commun A13/316 (C).

2.4.2. Résultats du séquençage

Afin de vérifier si la séquence amplifiée par PCR classique correspond bien à une partie du génome de *Brucella spp.*, nous nous sommes servis du programme BLASTN disponible sur le site internet du NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch).

Que ce soit pour le gène *bcs p 31* ou pour le gène *omp 25*, les séquences obtenues pour les trois marsouins correspondent à celles de *Brucella spp.* dont *Brucella ceti*. Pour le phoque A13/316, le séquençage obtenu était de moins bonne qualité, ne permettant qu'une analyse de petites séquences et corrélant à une bactérie environnementale non spécifique, *Dehalococcoides spp.* à 86%. Cet animal est donc un faux positif à *Brucella spp.*. En ce qui concerne le phoque gris A12/1999 et le dauphin commun A13/1034, le CERVA a réalisé un biotypage à partir d'une culture bactérienne, permettant d'affirmer la présence respective de *Brucella pinnipedialis* et *Brucella ceti*.

3. Conclusion et discussion sur la Brucellose marine

Les résultats de RT-PCR ont permis de d'estimer la prévalence de la brucellose chez les mammifères marins à 11,86% (7/59). Quatre espèces de mammifères marins ont été testées positifs à *Brucella* à savoir le marsouin commun, le dauphin commun, le phoque veau-marin et le phoque gris. Le lagénorrhynque à bec blanc et les trois globicéphales dont les causes d'échouages n'ont pas été objectivées ont présenté un résultat négatif à la brucellose par RT-PCR.

Les expériences d'immunohistochimie sur des prélèvements d'organes des animaux positifs par RT-PCR ont révélé que la rate est l'organe majoritairement infecté suivi des poumons et des nœuds lymphatiques thoraciques. De manière intéressante, les lames d'encéphale du dauphin A13/1034, présentant une méningoencéphalite, ont été colorées positivement. C'est le premier cas de méningoencéphalite due à *Brucella* décrite chez un dauphin commun. Les deux cas précédemment publiés concernaient des dauphins bleu et blanc.

Nous avons également pu réaliser des PCR à partir de nématodes des voies respiratoires du phoque gris A12/1999 et du marsouin A09/1943 qui sont ressorties négatives. Pourtant le poumon du marsouin A09/1943 présentait une coloration d'immunohistochimie positive. Ces résultats ne permettent pas d'apporter des preuves quant à la transmission de la bactérie par des parasites des voies respiratoires. Avec les limites de la méthode et de l'échantillonnage lors de l'extraction d'ADN, les vers respiratoires n'étaient pas porteurs de la bactérie alors que les poumons étaient infectés.

Enfin, le séquençage a eu pour but d'éliminer les faux positifs.

De nombreuses méthodes sérologiques ont été utilisées afin de déterminer l'exposition des mammifères marins à *Brucella spp.* Les taux de séropositivité variables ont été obtenus dans de nombreuses espèces de cétacés et de pinnipèdes de l'Atlantique et du Pacifique Nord, suggérant une exposition enzootique dans certaines populations marines. De nombreux isolements microbiologiques ont été mis en évidence mais jusqu'à présent, aucune évidence de pathologie induite par *Brucella* n'a été révélée chez les pinnipèdes. Les méthodes de PCR sont de plus en plus utilisées en diagnostic mais peu d'études utilisent cette méthode pour déterminer la prévalence de l'infection chez les mammifères marins. Le choix de la cible du

gène *bcsP 31* résulte du fait que c'est un gène conservé dans la famille de *Brucella* et dont la faible taille de l'amplicon (151 pb) facilite son utilisation par RT-PCR (Sidor *et al.*, 2013). Cette étude constitue la première analyse de la brucellose dans les mammifères marins sur les côtes françaises de la Manche. Dans notre étude, nous avons obtenu une prévalence totale de 11,86% (7/59) par RT-PCR. Le séquençage par la méthode de Sanger nous a permis de révéler que le phoque A13/316 est en réalité un faux positif par RT-PCR. Les ADN amplifiés par PCR classique du marsouin A09/1438, du dauphin commun A13/1034 et du phoque gris A12/1999 n'ont pas pu être séquencés. Le CERVA a mis en culture le nœud lymphatique bronchique du phoque gris A12/1999 et le poumon du dauphin commun A13/1034, ressortis positifs à la RT-PCR, ce qui a permis d'isoler *Brucella pinnipedialis* et *Brucella ceti* respectivement. Nous avons donc la confirmation de l'isolement de *Brucella spp.* pour trois marsouins, un phoque gris et un dauphin commun. Ainsi, nous avons la certitude que 5 animaux hébergent bien *Brucella spp.* soit une prévalence de 8,47% (5/59). Pour la zone de notre étude, sur 137 marsouins communs échoués en Mer du Nord, la bactérie a pu être identifiée chez seulement six animaux soit 4,4% des individus. Sur la même période, la bactérie a été isolée de 5 phoques communs sur 42 animaux analysés soit une incidence de 11,9% et trois phoques gris sur les 13 analysés soit 23,1% (Alonso-Velasco *et al.*, 2013). Sur les côtes de l'Allemagne, l'incidence de la brucellose est de 11% chez les phoques veaux-marins (47/426), 2,9% chez les phoques gris (1/34) et 0,7% chez les marsouins communs (Prenger-Berninghoff *et al.*, 2008).

La prévalence obtenue est estimée. D'une part, elle peut être surestimée du fait que le statut pathologique des animaux échoués augmente l'incidence de *Brucella spp.* D'autre part, l'extraction d'ADN à partir des organes testés se réalise sur des fragments de seulement 25 mg, limitant la zone testée par RT-PCR. Cette donnée combinée à la valeur élevée des Ct obtenus, révélant une faible concentration en bactérie, suggèrent une sous-estimation de la prévalence réelle de *Brucella* dans la population de mammifères marins des côtes françaises de la Manche. Dans notre étude, cette sous-estimation se matérialise par les résultats contraires des duplicatas pour quatre des cinq animaux obtenus positifs par notre expérience. De même, le marsouin commun A09/1438 s'est révélé négatif au CERVA tandis que nous l'avons obtenu positif ; et le contraire pour le dauphin commun A13/1034. Ainsi, en répétant les PCR et en fonction de la zone de tissu prélevée, le résultat peut être différent. Nous possédons des échantillons de taille trop faible pour vraiment évoquer une prévalence par

espèce. Il est souvent reconnu que les valeurs de prévalence sont plus élevées dans les populations de pinnipèdes que de cétacés (Godfroid *et al.*, 2014).

Les marsouins communs sont les cétacés les plus répandus dans le Mer du Nord et la Manche. *Brucella ceti* a été détectée chez ces animaux en Ecosse (Dagleish *et al.*, 2008 ; Maquart *et al.*, 2009) et en Belgique (Jauniaux *et al.*, 2010). Dans cette étude, *Brucella* a été identifiée dans les organes du système respiratoire (poumon, nœud lymphatique bronchique et nœud lymphatique pulmonaire) et le nœud lymphatique préscapulaire qui sont les organes fréquemment obtenus positifs (Godfroid *et al.*, 2014). Le fait de n'avoir testé que ces organes peut aussi avoir discriminé la valeur réelle de la prévalence.

Les expérimentations d'immunohistochimie, utilisant un antisérum polyclonal obtenu à partir de lapins expérimentalement infectés par *Brucella melitensis*, ont montré une coloration diffuse intracytoplasmique dans les cellules mononucléaires de nombreux tissus. Les cellules colorées sont de type macrophages ce qui correspond aux cellules hôtes de *Brucella* chez tous les mammifères. Pour interpréter les résultats d'immunohistochimie, nous ne prendrons pas en compte le phoque commun A13/316 qui s'est avéré être un faux positif. Au total, nous avons testé 46 organes de cinq animaux différents (aucun échantillon pour le marsouin A10/1279). Treize lames ont montré une coloration positive soit un pourcentage de 28,3%, neuf une coloration suspecte soit 19,6% et enfin vingt-quatre ont été négatives soit un pourcentage de 52,1%. La majorité des organes sont donc négatifs par immunohistochimie. Il est donc réellement intéressant de multiplier les expériences sur différents organes afin de diagnostiquer l'infection. Le tableau 23 détaille les résultats d'immunohistochimie pour chaque organe testé. Malgré le faible nombre d'échantillons testés, la rate semble l'organe le plus souvent positif par immunohistochimie, même en l'absence de lésions macroscopiques et/ou microscopiques. Chez les cétacés, les colorations positives d'immunohistochimie dans le cytoplasme de cellules de type macrophages ont été observées sur des coupes d'abcès testiculaires, de rate, de cerveau, de nœud lymphatique, de poumon, d'utérus, de pancréas, de glandes mammaires, de lait et de parasites (Miller *et al.*, 1999 ; Hernandez-Mora *et al.*, 2008 ; Gonzales-Barrientos *et al.*, 2010 ; Jauniaux *et al.*, 2010 ; Davison *et al.*, 2013).

Tableau 23: Résultats des expériences d'immunohistochimie par organe.

| ORGANE | COLORATION POSITIVE | COLORATION SUSPECTE | COLORATION NEGATIVE |
|---|--|--|--|
| Encéphale | 2/3 animaux testés 2/13 encéphales testés | 3/3 animaux testés 5/13 encéphales testés | 2/3 animaux testés 6/13 encéphales testés |
| Poumon | 2/5 | 1/5 | 2/5 |
| Cœur | 0/3 | 0/3 | 3/3 |
| Nœud lymphatique préscapulaire | 2/3 | 0/3 | 1/3 |
| Nœud lymphatique bronchique | 1/2 | 0/2 | 1/2 |
| Nœud lymphatique pulmonaire | 0/2 | 2/2 | 0/2 |
| Autres nœuds lymphatiques | | | Nœud lymphatique mésentérique |
| Rate | 4/5 | 0/5 | 1/5 |
| Foie | 1/4 | 0/4 | 3/4 |
| Rein | 1/3 | 1/3 | 1/3 |
| Glande mammaire | 0/2 | 0/2 | 2/2 |
| Tractus reproducteur : utérus et ovaire | 0/2 | 0/2 | 2/2 |

Sur les cinq animaux positifs et pour lesquels nous avons réalisé l'immunohistochimie, tous présentaient une pneumonie aiguë à chronique associée pour deux marsouins et le phoque gris à du parasitisme dans les voies respiratoires. Cette lésion est souvent associée à des animaux positifs à la brucellose par diverses méthodes diagnostiques (Center for Food Security and Public Health, 2009 ; Godfroid *et al.*, 2010; Hernandez-Mora *et al.*, 2013 ; Lambourn *et al.*, 2013). Dans notre étude, quatre des cinq poumons étaient positifs par RT-PCR et seulement deux ont présenté une coloration positive par immunohistochimie. Les voies de transmission de cette maladie chez les mammifères marins ne sont pas clairement établies (Foster *et al.*, 2002 ; Dawson *et al.*, 2008a). Macroscopiquement, trois animaux assurés positifs présentaient une parasitose des voies respiratoires par des nématodes. Nous savons que la transmission de *Brucella* par des vers pulmonaires peut être possible (Perrett *et al.*, 2004a ; Dawson *et al.*, 2008a ; Prenger-Berninghoff *et al.*, 2008), cependant les deux parasites testés par RT-PCR en duplicata dans notre étude se sont avérés négatifs. Il existe donc d'autres voies de transmission. Les tractus reproducteurs de deux marsouins positifs ont été négatifs par immunohistochimie, la transmission par voie vénérienne ayant été suggérée chez les cétacés (Miller *et al.*, 1999, Center for Food Security and Public Health, 2009 ; Godfroid *et al.*, 2010; Guzman-Verri *et al.*, 2012).

La coloration positive d'immunohistochimie dans certains organes peut suggérer que *Brucella* serait responsable des lésions histopathologiques associées. Le dauphin commun A13/1034 présentait une méningoencéphalite subaiguë périvasculaire avec épaissement et congestion des méninges et des cellules inflammatoires des méninges ont révélé une coloration positive par immunohistochimie. D'autres études évoquent des méningoencéphalites associées à *Brucella ceti* chez des dauphins bleu et blanc (Gonzales *et al.*, 2002 ; Davison *et al.*, 2009), des dauphins à flancs blancs (Dagleish *et al.*, 2007) et un marsouin commun (Jauniaux *et al.*, 2010). Il s'agit donc de la première observation de méningoencéphalite due à *Brucella spp.* chez un dauphin commun. Ce dauphin présentait également une hypoplasie de l'appareil génital. Nous n'avons pas eu à notre disposition des échantillons de testicules pour les tester. Cependant, le tropisme génital de *Brucella* pourrait en être la cause.

Enfin, pour trois des cinq animaux positifs testés en immunohistochimie, des pétéchies dans le lard sous-cutané ont été observés lors de l'autopsie. Nous ne parvenons pas à expliquer cette donnée, sachant qu'elle n'est pas mentionnée dans les publications, mais le Dr Thierry Jauniaux observe fréquemment cette lésion chez les animaux infectés par *Brucella*.

Le fait dans que tous les cas, plusieurs organes ressortent positifs à *Brucella* par PCR ou par immunohistochimie, qu'il y ait des lésions ou non associées, suggèrent une bactériémie avec localisation secondaire de la bactérie (Jauniaux *et al.*, 2010 ; Godfroid *et al.*, 2014).

Les lames d'immunohistochimie ont révélé que la distribution de la coloration positive à *Brucella* est très hétérogène dans un tissu, se présentant surtout sous forme de « spots de couleur ». Cette distribution explique la difficulté d'obtenir des résultats positifs en PCR. En effet, l'extraction d'ADN se réalise à partir d'un fragment d'organe très petit, ce qui complique la probabilité de prélever une zone où la bactérie est présente. Ceci suggère une sous-estimation de la prévalence réelle. L'immunohistochimie permet de balayer une surface plus importante des organes.

En ce qui concerne le phoque commun A13/316, la RT-PCR du poumon était positive et quatre organes ont présenté une coloration positive à *Brucella spp.* Or, le séquençage a en réalité démontré que cet animal était un faux positif. Ce cas particulier démontre la difficulté du diagnostic de la brucellose chez les animaux marins. Deux méthodes de laboratoire sensibles et spécifiques se sont avérées erronées. Cependant, bien que la RT-PCR utilisée soit très sensible et spécifique du genre *Brucella*, la méthode d'immunohistochimie utilisée l'est

moins. En effet, nous avons utilisé un anticorps polyclonal moins spécifique qu'un anticorps monoclonal. De plus, les anticorps produits étaient dirigés contre *Brucella melitensis* et non des *Brucella* marines, diminuant encore la spécificité du test. En raison de cela, les faux négatifs sont plus importants. Rappelons aussi qu'un des deux duplicatas testés en RT-PCR était négatif. Il est donc important de multiplier les expériences et d'avoir recours à des méthodes très fiables comme le séquençage ou la culture bactérienne. Cet échec de discrimination a stimulé le développement de méthodes de typage moléculaire comme le Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis (MLVA).

Le rôle des parasites dans la transmission des *Brucella* entre individus est une question à l'étude. Dans notre travail, nous avons pu réaliser des RT-PCR sur des nématodes pulmonaires du phoque gris A12/1999 et du marsouin commun A09/1943. Les PCR ont été négatives alors que le poumon du marsouin A09/1943 était positif par immunohistochimie. Rappelons que les poumons de mammifères marins sont souvent infectés par *Brucella* et que l'hypothèse privilégiée actuellement dans le monde scientifique est une transmission de la bactérie aux poumons *via* les nématodes pulmonaires. Ici, nous n'avons pas pu apporter une preuve supplémentaire à cette hypothèse.

Enfin, il est important de souligner l'impact zoonotique réel des *Brucella* marines. Ces souches de *Brucella* isolées de mammifères marins sont connues pour infecter des humains par la consommation de poissons et de crustacés crus (Sohn *et al.*, 2003 ; McDonald *et al.*, 2006) et *via* le travail de laboratoire (Brew *et al.*, 1999). Ces cas mettent en avant l'implication zoonotique d'agents pathogènes non terrestres en l'absence de contact direct avec des mammifères marins (Dawson *et al.*, 2008a). A ce jour, seule une souche de *Brucella* de mammifères marins semble infecter les humains (Nymo *et al.*, 2011) et aucun cas animal ou humain n'a été décrit dans l'hémisphère Nord. Cependant, le potentiel zoonotique doit être pris en considération et devrait être caractérisé par des études. Etudes d'autant plus importantes que le charognage de mammifères marins échoués potentiellement infectés par des animaux terrestres pourraient répandre la bactérie (Foster *et al.*, 2002).

CONCLUSION GENERALE

La brucellose est une maladie infectieuse zoonotique bien connue chez les ruminants terrestres. Elle a été mise en évidence également chez les mammifères marins en 1994. *Brucella ceti* et *Brucella pinnipedialis* sont les deux espèces reconnues à l'heure actuelle. Peu de données sont disponibles à leur sujet. Les pinnipèdes semblent être des porteurs sains de la bactérie tandis que les cétacés peuvent développer des lésions de type méningite, orchite ou placentite avec avortements. Cette étude s'inscrit dans le cadre des recherches européennes menées actuellement sur cette maladie. Elle a présenté un double enjeu. Le premier a été d'étudier les échouages de marsouins et de phoques veaux-marins sur les côtes françaises de la Manche depuis 1995. De plus en plus de mammifères s'échouent, surtout les juvéniles, et les activités humaines sont au centre de cette augmentation avec les captures par les filets de pêche. Le second enjeu a été de démontrer la présence de *Brucella* marines dans nos eaux afin de pouvoir au mieux prévenir les contaminations humaines. Cette bactérie ayant été découverte plutôt récemment, en 1994, les données sont encore restreintes mais s'enrichissent de plus en plus.

Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence le premier cas de méningoencéphalite probablement liée à *Brucella* chez un dauphin commun. De même, nous avons pu obtenir une première prévalence réelle sur une côte française, de 8,47%. A partir des échantillons dont nous disposions, aucune lésion n'a pu être liée à *Brucella* chez les pinnipèdes.

Concernant la physiopathologie de la maladie, les organes de la sphère respiratoire semblent être les plus infectés par *Brucella*, posant la question de la transmission par des nématodes pulmonaires. Le cycle parasitaire de ces nématodes faisant intervenir les poissons, les conséquences pour la santé humaine serait considérable si des preuves de la présence de *Brucella* marines dans la chair des poissons étaient démontrées. Cependant, si les poissons pouvaient réellement être infectés et transmettre la bactérie, de nombreux cas de brucellose humaine auraient été diagnostiqués, particulièrement à l'heure actuelle où le poisson cru est une mode culinaire. Rappelons tout de même que la maladie est difficile à diagnostiquer. Dans cette optique, une perspective est de caractériser le potentiel zoonotique des *Brucella* des mammifères marins en Europe, puisque les trois personnes naturellement infectées par des *Brucella* marines n'ont eu aucun contact avec ces animaux.

Enfin, cette étude a aussi démontré la difficulté pour diagnostiquer la brucellose chez les mammifères marins, de faux positifs par RT-PCR et immunohistochimie étant présents. Ces résultats confirment la nécessité de développer des méthodes de laboratoire spécifiques

des *Brucella* marines afin d'augmenter la spécificité. Il est difficile d'obtenir une population dont le statut envers la brucellose est avéré afin de développer des méthodes de laboratoire plus sensibles et spécifiques aux *Brucella* marines, la culture (le Gold Standard) étant dangereuse au vue du potentiel zoonotique de la bactérie et ne pouvant être réalisée que dans des laboratoires agréés.

BIBLIOGRAPHIE

ALONSO-VELASCO E., JAUNIAUX T., MICHEL P., GODFROID J., FRETIN D. (2013). *Brucella* surveillance in stranded marine mammals from the North Sea. Poster pour 5th Symposium of the Belgian Wildlife Disease Society, Tervuren, Belgique.

BANAI M., CORBEL M. (2010). Taxonomy of *Brucella*. *The Open Veterinary Science Journal*, **4**, 85-101.

BINGHAM J., TAYLOR T.K., SWINGLER J.E., MEEHAN G., MIDDLETON D.J., MACKERETH G.F., O'KEEFE J.S., DANIELS P.W. (2008). Infection trials in pigs with a human isolate of *Brucella* (isolate 02/611 'marine mammal type'). *New Zealand Veterinary Journal*, **56**, 10-14.

BOUVEROUX T., KISZKA J., HEITHAUS M., JAUNIAUX T., PEZERILS S. (2014). Direct evidence for gray seal (*Halichoerus grypus*) predation and scavenging on harbor porpoise (*Phocoena phocoena*). *Marine Mammal Science*, **30**, 1542-1548.

BREW S.D., PERRETT L.L., STACK J.A., MACMILLAN A.P., STAUNTON N.J. (1999). Human exposure to *Brucella* recovered from a sea mammal. *The Veterinary Record*, **144**(17), 483.

CARVALHO-NOTA A., MOL J., XAVIER M., PAIXAO T., LAGE A., SANTOS R. (2010). Pathogenesis of bovine brucellosis. *The Veterinary Journal*, **184**(2), 146-155.

CASSLE S.E., JENSEN E.D., SMITH C.R., MEEGAN J.M., JOHNSON S.P., LUTMERDING B., RIDGWAY S.H., FRANCIS-FLOYD R. (2013). Diagnosis and successful treatment of a lung abscess associated with *Brucella* species infection in a Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **44**(2), 495-499.

CAULET-MAUGENDRE S. (1999). Immunohistochimie: aspects techniques actuels; applications pratiques et scientifiques en anatomie et cytologie pathologiques. *Revue Française Histotechnologie*, **12**(1), 23-34.

CENTER FOR FOOD SECURITY AND PUBLIC HEALTH (CFSPH) (2009). Brucellosis in marine mammals. CSFPH, Iowa State University, Ames, Iowa. Disponible sur: www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis_marine.pdf. (consulté le 12 Août 2015).

CHAKROUN M., BOUZOUAIA N. (2007). La Brucellose: une zoonose toujours d'actualité. *Rev Tun Infectiology*, **1**, 1-10.

CHRISTOPHER S., UMARATHY B., RAVIKUMAR K. (2010). Brucellosis: review on the recent trends in pathogenicity and laboratory diagnosis. *Journal Laboratory Physicians*, **2**, 55-60.

CLOECKAERT A., GRAYON M., GREPINET O. (2000). AnIS711 Element Downstream of the *bp26* Gene Is a Specific Marker of *Brucella* spp. Isolated from Marine Mammals. *Clinical and Diagnostic laboratory immunology*, **7**, 835-839.

CLOECKAERT A., VERGERA JM., GRAYONA M., PAQUET JY., GARIN-BASTUJIC B., FOSTERD G., GODFROID J. (2001). Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus. *Microbes and Infection*, **3**, 729-738.

CLOECKAERT A., GRAYON M., GREPINET O., BOURMEDINE KS. (2003). Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals by infrequent restriction site-PCR and development of specific PCR identification tests. *Microbes and Infection*, 593-602. 10.1016/S1286-4579(03)00091-1.

CLOECKAERT A., BERNARDET N., KOYLASS M., WHATMORE A., ZYGMUNT M. (2011). Novel IS711 Chromosomal Location Useful for Identification of Marine Mammal *Brucella* Genotype ST27, Which Is Associated with Zoonotic Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, **49**(7), 3954-3959.

CORBEL M., BANAI M. (2005). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. *Springer*, **2**, 370-386.

DAGLEISH M.P., BARLEY J., HOWIE F.E., REID R.J., HERMAN J. & FOSTER G. (2007). Isolation of *Brucella* species from a diseased atlanto-occipital joint of an Atlantic white-sided dolphin (*Lagenorhynchus acutus*). *Veterinary Record*, **160** (25), 876-878.

DAGLEISH M.P., BARLEY J., FINLAYSON J., REID R.J. & FOSTER G. (2008). *Brucella ceti* associated pathology in the testicle of a harbour porpoise (*Phocoena phocoena*). *Journal of comparative pathology*, **139**, 54–59.

DAVISON N.J., CRANWELL M.P., PERRETT L.L., DAWSON C.E., DEAVILLE R., STUBBERFIELD E.J., JARVIS D.S. & JEPSON P.D. (2009). Meningoencephalitis associated with *Brucella* species in a live-stranded striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) in southwest England. *Veterinary Record*, **165**(3), 86–89.

DAVISON N.J., PERRETT L.L., LAW R., STUBBERFIELD E., MONIES R., DEAVILLE R., JEPSON P. (2011). Infection with *Brucella ceti* and high levels of polychlorinated biphenyls in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) stranded in the South-west England. *Veterinary Record*, **169**, 14.

DAVISON N.J., BARNET J.E.F., PERRETT L.L., DAWSON C., PERKINS M., DEAVILLE R., JEPSON P. (2013). Meningoencephalitis and Arthritis Associated with *Brucella ceti* in a Short-beaked Common Dolphin (*Delphinus delphis*). *Journal of Wildlife Diseases*, **49**(3), 632–636.

DAWSON C.E., PERRETT L.L., STUBBERFIELD E., STACK J., FARRELLY S., COOLEY W., DAVISON N., QUINNEY S. (2008a). Isolation and characterization of *Brucella* from the lungworms of a harbor porpoise (*Phocoena phocoena*). *Journal of Wildlife Diseases*, **44**(2), 237–246.

DAWSON C.E., STUBBERFIELD E., PERRETT L.L., KING A., WHATMORE A., BASHIRUDDIN J., STACK J., MAC MILLAN A. (2008b). Phenotypic and molecular characterisation of *Brucella* isolates from marine mammals. *BMC Microbiology* ,**8**, 224. doi :10.1186/1471-2180-8-224.

DE FIGUEIREDO P., FICHT T., RICE-FICHT A., ROSSETTI C. et ADAMS L. (2015). Pathogenesis and immunobiology of brucellosis Review of *Brucella*-Host Interactions, *The American Journal of Pathology*, **185** (6), p. 1505-1517.

EL-TRAS W., TAYEL A., ELTHOLTH M., GUITIAN J. (2010). *Brucella* infection in fresh water fish: Evidence for natural infection of Nile catfish, *Clarias gariepinus*, with *Brucella melitensis*. *Veterinary Microbiology* ,**141**, 321–325.

EWALT D., PAYEUR J., MARTIN B., CUMMINS D., MILLER W. (1994). Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **6**, 448-452.

FOSTER G., MACMILLAN A.P., GODFROID J., HOWIE F., ROSS H.M., CLOECKAERT A., REID R.J., BREW S. & PATTERSON I.A. (2002). A review of *Brucella* sp. infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland, *Veterinary Microbiology*, **90** (1-4), 563-580.

FOSTER G., OSTERMAN B., GODFROID J., JACQUES I., CLOECKAERT A. (2007). *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **57**, 2688-2693.

GAGNIERE J.P. *et al.* (2012). La brucellose animale, Polycopié des Unités de maladies contagieuses des Ecoles vétérinaires françaises, *MERIAL (Lyon)*, 49 p.

GARCIA-YOLDI D., MARIN C., DE MIGUEL M., MUNOZ P., VIZMANOS J., LOPEZ-GONI I. (2006). Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1. *Clinical Chemistry* **52**, **4**, 779-781.

GARNER M., LAMBOURN D., JEFFRIES S., BRIGGS HALL P., RHYAN J., EWALT D., POLZIN L., CHEVILLE N. (1997). Evidence of *Brucella* infection in *Parafilaroides* lungworms in a Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **9**, 298-303.

GODFROID J., NYMO I., TRYLAND M., CLOECKAERT A., JAUNIAUX T. (2010). Marine mammal brucellosis, document fourni à la Faculté Vétérinaire de Liège.

GODFROID J., DEBOLLE X., ROOP P., O'CALLAGHAN D., TSOLIS R., BALDWIN C., SANTOS R., MCGIVEN J., OLSEN S., NYMO I., LARSEN A., AL DAHOUK S., LETESSON J. (2014). The quest for a true One Health perspective of Brucellosis, *Review Scientific and Technical of the Office International des Epizooties*, **33**, 521-538.

GOLDSTEIN T., ZABKA T.S., DELONG R.L., WHEELER E.A., YLITALO G., BARGU S., SILVER M., LEIGHFIELD T., VAN DOLAH F., LANGLOIS G., SIDOR I.,

DUNN J.L. & GULLAND F.M. (2009). The role of domoic acid in abortion and premature parturition of California sea lions (*Zalophus Californianus*) on San Miguel Island, California. *Journal of Wildlife Disease*, **45** (1), 91–108.

GOLDSTEIN T., GILL V., TUOMI P., MONSON D., BURDIN A., CONRAD P., DUNN J., FIELD C., JOHNSON C., JESSUP D., BODKIN J., DOROFF A. (2011). Assessment of clinical pathology and pathogen exposure in sea otters (*Enhydra lutris*) bordering the threatened population in Alaska. *Journal of Wildlife Disease*, **47**, 579-592.

GONZALES L., PATTERSON I.A., REID R.J., FOSTER G., BARBERAN M., BLASCO J.M., KENNEDY S., HOWIE F.E., GODFROID J., MACMILLAN A.P., SHOCK A. & BUXTON D. (2002). Chronic meningoencephalitis associated with *Brucella sp.* infection in live-stranded striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Journal of comparative Pathology*, **126**, 147–152.

GONZALES-BARRIENTOS R., MORALES J., HERNANDEZ-MORA G., BARQUERO-CALVO E., GUZMAN-VERRI C., CHAVES-OLARTE E., MORENO E. (2010). Pathology of Striped Dolphins (*Stenella coeruleoalba*) Infected with *Brucella ceti*. *Journal of Comparative Pathology*, **142**, 347-352.

GROUSSAUD P., SHANKSTER S., KOYLASS M., WHATMORE A. (2007). Molecular typing divides marine mammal strains of *Brucella* into at least three groups with distinct host preferences. *Journal of Medical Microbiology*, **56**, 1512–1518.

GUZMAN-VERRI C., GONZALES-BARRIENTOS R., HERNANDEZ-MORA G., MORALES J., BARQUERO-CALVO E., CHAVES-OLARTE E., MORENO E. (2012). *Brucella ceti* and Brucellosis in cetaceans. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **2**, doi :10.3389/fcimb.2012.00003.

HAELTERS ET CAMPHUYSEN (2009). *The harbour porpoise in the southern North Sea: abundance, threats and research- & management proposals*. Royal Belgian Institute of Natural Sciences (RBINS), department Management Unit of the North Sea Mathematical Models (MUMM) & Royal Netherlands Institute for Sea Research (NIOZ) Project financed by IFAW (International Fund for Animal Welfare) - IFAW Internationaler TierschutzFonds GmbH, IFAW, Brussels, 60p.

HAELTERS J., KERCKHOF F., JACQUES T.G., DEGRAER S. (2011). The harbour porpoise *Phocoena phocoena* in the Belgian part of the North Sea: trends in abundance and distribution. *Belg. J. Zool.*, **141**(2), 75-84.

HAELTERS J., KERCKHOF F., JAUNIAUX T., DEGRAER S. (2012). The grey seal (*Halichoerus grypus*) as a predator of harbour porpoise (*Phocoena phocoena*)?, *Aquatic Mammals*, **38**, 343-353.

HANNI K., MAZET J., GULLAND F., ESTES J., STAEDLER M., MURRAY M., MILLER M., JESSUP D. (2003). Clinical pathology and assesment of pathogen exposure in southern and alaskan sea otters. *Journal of Wildlife Diseases*, **39**, 837-850.

HERNANDEZ-MORA G., GONZALES-BARRIENTOS R., MORALES J., CHAVES-OLARTE E., GUZMAN-VERRI C., BARQUERO-CALVO E., DE-MIGUEL M., MARIN C., BLASCO JM., MORENO E. (2008). Neurobrucellosis in Stranded Dolphins, Costa Rica. *Emerging Infectious Diseases*, **14** (9), 1430-1433.

HERNANDEZ-MORA G., MANIRE C.A., GONZALES-BARRIENTOS R., BARQUERO-CALVO E., GUZMAN-VERRI C., STAGGS L., THOMPSON R., CHAVES-OLARTE E. & MORENO E. (2009). Serological diagnosis of *Brucella* infections in odontocetes. *Clin.vaccine Immunol.*, **16**(6), 906–915.

HERNANDEZ-MORA G., PALACIOS-ALFARO JD. , GONZALEZ-BARRIENTOS R. (2013). Wildlife reservoirs of brucellosis: *Brucella* in aquatic environments. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, **32**(1), 89-103.

JACQUES I., GRAYON M., BERGER JM. (2006). Oxidative metabolic profiles of *Brucella* strains isolated from marine mammals: contribution to their species classification. *FEMS Microbiology Letters*, **270**, 245–249.

JAHANS K.L., FOSTER G. & BROUGHTON E.S. (1997). The characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *Vet. Microbiol.*, **57**(4), 373–382.

JAUNIAUX T., GARCIA HARTMANN M., HAELTERS J., TAVERNIER J., COIGNOUL F. (2002). Echouage de mammifères marins: guide d'intervention et procédures d'autopsie, *Ann. Méd. Vét.*, 2002, **146**, 261-216.

JAUNIAUX T., BRENEZ C., FRETIN D., GODFROID J., HAELTERS J., JACQUES T., KERCKHOF F., MAST J., SARLET M., COIGNOUL F. (2010). *Brucella ceti* Infection in Harbor Porpoise (*Phocoena phocoena*). *Emerging Infectious Diseases*, 16(12), 1966-1968.

JAUNIAUX T., COIGNOUL F. (2013). *Les échouages de mammifères marins en 2012*. Rapport d'activité annuel 2012, Université Vétérinaire de Liège, 52p.

JAUNIAUX T., GARIGLIANY M., LOOS P., BOURGAIN JL., BOUVEROUX T., COIGNOUL F., HAELTERS J., KARPOUZOPOULOS J., PEZERIL S., DESMECHT D. (2014). Bite injuries of Gray seals (*Halichoerus grypus*) on Harbour porpoises (*Phocoena phocoena*). *PLoS One*, 9(12), 9p.

JENSEN S., NYMO I., FORCADA H., HALL A., GODFROID J. (2013). *Brucella* antibody seroprevalence in Antarctic seals (*Arctocephalus gazella*, *Leptonychotes weddellii* and *Mirounga leonina*). *Diseases of Aquatic Organisms*, **105**, 175–181.

KIM D., PARK J., KIM S., SOH Y., KIM H., OH B., SONG J. (2013). *Brucella* immunogenic BP26 forms a channel-like structure. *Journal of Molecular Biology*, **425** (7).

LAFLECHE P., JACQUES SI., GRAYON M., AL DAHOUK S., BOUCHON P., DENOEUDE F., NÖCKLER K., NEUBAUER H., GUILLOTEAU L., VERGNAUD G. (2006). Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BioMed Central Microbiology*, **6**, 9. doi : 10.1186/1471-2180-6-9.

LAMBOURN D., GARNER M., EWALT D., RAVERTY S. (2013). *Brucella pinnipedialis* infections in Pacific Harbor Seals (*Phoca vitulina richardsi*) from Washington State, USA. *Journal of Wildlife Diseases*, **49**(4), 802–815.

LARSEN A., NYMO I., BRIQUEMONT B., SORENSEN K., GODFROID J. (2013). Entrance and Survival of *Brucella pinnipedialis* Hooded Seal Strain in Human Macrophages and Epithelial. *PLoS One*, 8, Issue 12.

LEOPOLD MF., BEGEMAN L., VAN BLEIJSWIJK JD., IJSSEDIJK L., WITTE H., GRONE A. (2015). Exposing the grey seal as a major predator of harbour porpoises. *Proceedings Royal Society B*, 282 :20142429.

LOPEZ-GONIL, GARCIA-YOOLDI D., MARIN CM., DE MIGUEL MJ., MUNOZ PM., BLASCO JM. (2008). Evaluation of a Multiplex PCR Assay (Bruce-ladder) for Molecular Typing of All *Brucella* Species, Including the Vaccine Strains. *Journal of clinical microbiology*, **46**(10), 3484-3487.

LYNCH M., DUIGNAN P.J., TAYLOR T., NIELSEN O., KIRKWOOD R., GIBBENS J. & ARNOULD J.P. (2011). Epizootiology of *Brucella* infection in Australian fur seals. *Journal of Wildlife Diseases*, **47** (2), 352– 363.

MANCILLA M. (2016). Smooth to Rough Dissociation in *Brucella*: The Missing Link to Virulence, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5:98. doi: 10.3389/fcimb.2015.00098.

MAQUART M., LE FLECHE P., FOSTER G., TRYLAND M. (2009). MLVA-16 typing of 295 marine mammal *Brucella* isolates from different animal and geographic origins identifies 7 major groups within *Brucella ceti* and *Brucella pinnipedialis*. *BioMed Central Microbiology*, **9** : 145. doi :10.1186/1471-2180-9-145.

MAQUART M., FARDINI Y., ZYGMUNT M., CLOECKAERT A. (2008). Identification of novel DNA fragments and partial sequence of a genomic island specific of *Brucella pinnipedialis*. *Veterinary Microbiology*. doi:10.1016/j.vetmic.2008.04.015.

MARKEY B., FINOLA L., ARCHAMBAULT M., CULLINANE A., MAGUIRE D. (2013). *Clinical Veterinary Microbiology, Second Edition. MOSBY ELSEVIER*, Paris, 325-333.

MARTYROSIAN A., MORENO E. et GORVEL J.P. (2011). An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen, *Immunological reviews*, **240**, p. 211-234.

MAURIN M. (2005). La brucellose à l'aube du 21^e siècle. *Méd Mal Infect.*, **35** (1), 6-16.

MCDONALD W., JAMALUDIN R., MACKERETH G., HANSEN M., HUMPHREY S., SHORT P., TAYLOR T., SWINGLER J., DAWSON C., WHATMORE A., STUBBERFIELD E., PERRETT L.L., SIMMONS G. (2006). Characterization of a *Brucella* sp. Strain as a Marine-Mammal Type despite Isolation from a Patient with Spinal Osteomyelitis in New Zealand. *Journal of Clinical Microbiology*, **44**(12), 4363–4370.

MEEGAN J., FIELD C., SIDOR I., ROMANO T., CASINGHINO S., SMITH C.R., KASHINSKY L., FAIR P. A., BOSSART G., WELLS R. & DUNN J.L. (2010). Development, validation, and utilization of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against *Brucella* species in marine mammals. *J. vet.diagn. Invest.*, **22**(6), 856–862.

MEEGAN J., DUNN J., VENN-WHATSON S., SMITH C., SIDOR I., JENSEN E., VAN BONN W., PUGH R., FICHT T., ADAMS L., NIELSEN K., ROMANO T. (2012). Serologic response in bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* infected with *Brucella* sp. using adolphin-specific indirect ELISA. *Diseases of Aquatic Organisms*, **102**, 73–85.

MILLER W., ADAMS G., FICHT T., CHEVILLE N., PAYEUR J., HARLEY D., HOUSE C., RIDGWAY S. (1999). *Brucella* induced abortions and infection in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **30**(1), 100-110.

NYMO IH., TRYLAND M., GODFROID J. (2011). A review of *Brucella* infection in marine mammals, with special emphasis on *Brucella pinnipedialis* in the hooded seals (*Cystophora cristata*). *Veterinary Research*, **42**(93), doi :10.1186/1297-9716-42-93.

OBSERVATOIRE PELAGIS. *Présentation*[enligne]. Disponible sur: <http://www.observatoire-pelagis.cnrs.fr/presentation/> (consulté le 23/09/2015).

OHISHI K., ZENITANI R., BANDO T., GOTO Y., UCHIDA K., MARUYAMA T., YAMAMOTO S., MIYAZAKI N. & FUJISE Y. (2003). Pathological and serological evidence of *Brucella*-infection in baleen whales (Mysticeti) in the western North Pacific, *Comp. Immunol.Microbiol.infect. Dis.*, **26**(2), 125–136.

OHISHI K., TAKISHITA K., KAWATO M., ZENITANI R., BANDO T., FUJISE Y., GOTO Y., YAMAMOTO S. & MARUYAMA T. (2004). Molecular evidence of new variant *Brucella* in North Pacific common minke whales. *Microbes Infect.*, **6**(13), 1199–1204.

OHISHI K., FUJISE Y., MARUYAMA T. (2008). *Brucella* spp. in the western north Pacific and Antarctic cetaceans: a review. *Journal of Cetacean Research and Management*, **10**, 67-72.

OIE. *Organisation mondiale de la santé animale* [en ligne]. Disponible sur http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/BCLS-FR.pdf. Consulté le 26/09/2015

PERRETT L.L., DAWSON C., DAVISON N., QUINNEY S. (2004a). *Brucella* infection of lung worms from a harbor porpoise. *Veterinary Record*, **154**, 800.

PERRETT L.L., BREW S., STACK J., MACMILLAN A., BASHIRUDDIN J. (2004b). Experimental assessment of the pathogenicity of *Brucella* strains from marine mammals for pregnant sheep. *Small Ruminant Research*, **51**, 221–228.

POESTER F., SAMARTINO L., SANTOS R. (2013). Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. *Review Scientific and Technical of the Office International des Epizooties*, **32**, 105-115.

POITRAS E., HOUDE A. (2002). La PCR en temps réel: principes et applications. *Biology and Biotechnology*, **2**(2), 2-11.

PRENGER-BERNINGHOFF E., SIEBERT U., STEDE M., KONIG A., WEIB R., BALJER G. (2008). Incidence of *Brucella* species in marine mammals of the German North Sea. *Diseases of Aquatic Organisms*, **81**, 65-71.

PROBERT W., SHRADER K., KHUONG N., BYSTROM S. and GRAVES M. (2004). Real-Time Multiplex PCR Assay for Detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**(3), 1290–1293.

RHYAN J., GIDLEWSKI T., EWALT D., STEVEN H., LAMBOURNE D., OLSEN S. (2001). Seroconversion and abortion in cattle experimentally infected with *Brucella* sp. isolated from a Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **13**, 379–382.

ROBARDS M., REEVES R. (2011). The global extent and character of marine mammal consumption by humans: 1970–2009. *Biological Conservation*, **144**, 2770-2786.

ROBINEAU, D. (2005). Cétacés De France. *Faune De France*, Paris, 646 p.

SALEM S.F. & MOHSEN A. (1997). Brucellosis in fish. *Veterinary Medicine*, **42**(1), 5–7.

SAMARAN F., WATREMEZ P., RIDOUX V. (2011). *Mise en place d'un suivi par acoustique passive des marsouins communs le long des côtes françaises. Revue bibliographique et recommandations*. Papier dans le cadre du programme d'acquisition de connaissances NATURA 2000 en mer, Université de la Rochelle, 53p.

SANGER F., NICKLEN S., COULSON A.R. (1977).DNA sequencing with chain terminating inhibitors.*Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **74**(12), 5463-5467.

SANTOS M.B., PIERCE G.J. (2003). The diet of harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) in the northeast atlantic. *Oceanography and Biology : an annual review*, **41**, 355-390.

SIDOR I., DUNN L., TSONGALIS G., FRASCA JR. S. (2013).A multiplex real-time polymerase chain reaction assay with two internal controls for the detection of *Brucella* species in tissues, blood, and feces from marine mammals.*Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **25**(1), 72–81.

SKENDROS P. et BOURA P. (2013). Immunity to brucellosis, *Revue scientifique et technique de OIE*, **32**, p. 137-147.

SOHN A., PROBERT W., GLASER C., GUPTA N., BOLLEN A., WONG J., GRACE E., MCDONALD W. (2003). Human Neurobrucellosis with Intracerebral Granuloma Caused by a Marine Mammal *Brucella* spp..*Emergeous Infectious Diseases*, **9**(4), 485–488.

TRYLAND M., KLEIVANE C., ALFRDSSON A., KJELD M., ARNASON A., STUEN S., GODFROID J. (1999). Evidence of *Brucella* infection in marine mammals in the North Atlantic Ocean.*Veterinary Record*, **144**, 588-592.

TRYLAND M., DEROCHER A., WIIG O., GODFROID J. (2001). *Brucella* sp. antibodies in polar bears from Svalbard and the barents sea. *Journal of Wildlife Diseases*, **37**, 523-531.

VAN BLEIJSWIJK J., BEGEMAN L., WITTE H., IJSSELDIJK L., BRASSEUR S., GRONE A., LEOPOLD M. (2014). Detection of grey seal *Halichoerus grypus* DNA in attack wounds on stranded harbour porpoises *Phocoena phocoena*.*Marine Ecology Progress Series*, **513**, 277-281.

VAN BRESSEM M., VAN WAEREBEEK K., RAGA J., GODFROID J., BREW S., MACMILLAN A. (2001). Serological evidence of *Brucella* species infection in odontocetes from the South Pacific and the Mediterranean.*Veterinary Record*, **148**, 657-661.

VAN CANNEYT O, AUTHIER M., DABIN W., DARS C., DEMARET F., DOREMUS G., PRELLWITZ F., SPITZ J. (2015). *Les échouages de mammifères marins sur le littoral français en 2014*. Rapport scientifique de l'Observatoire PELAGIS, 53p.

VIZCAINO N., CARO-HERNADEZ P., CLOECKAERT A., FERNANDEZ-LAGO L. (2004). DNA polymorphism in the omp25/omp31 family of *Brucella spp.* : identification of a 1.7-kb inversion in *Brucella cetaceae* and a 15.1- kb genomic island, absent from *Brucella ovis*, related to the synthesis of smooth lipopolysaccharide. *Microbes and Infection*, **6**, 821–834.

WHATMORE A., DAWSON C., GROUSSAUD P., KOYLASS M., KING A., SHANSKTER S., SOHN A., PROBERT W., MCDONALD W. (2008). Marine Mammal *Brucella* Genotype Associated with Zoonotic Infection. *Emerging Infectious Diseases*, **14**(3), 517–518.

WYATT, H.V (2013). Lessons from the history of brucellosis. *Revue scientifique et technique de l'OIE*, **32**, 17- 25.

**ANNEXE : LISTE DES MAMMIFERES MARINS
ECHOUES SUR LES COTES FRANCAISES DE
LA MANCHE ET AUTOPSIES A LA FACULTE
VETERINAIRE DE LIEGE**

M= Mâle

F= Femelle

NB= Nouveau-né

J= Juvénile

A= Adulte

ND= Non Déterminé

| Espèce | Numéro d'autopsie | Date d'échouage | Lieu d'échouage | Sexe | Age | Longueur du corps (cm) | Poids corporel (kg) | Epaisseur de lard dorsal (mm) | Etat d'embonpoint | Code de conservation | Contenu stomacal | Lésions macroscopiques | Cause probable de la mort | RT-PCR Brucella |
|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|------|-----|------------------------|---------------------|-------------------------------|--------------------|----------------------|------------------|---|---------------------------|------------------|
| Marsouin commun | A04/1335 | ?/04/04 | Dunkerque | M | J | 123 | 25 | 18 | Emaciation modérée | 2 | otolithes | hématomes sous cutanés, parasitose légère, œdème et congestion pulmonaire | capture | Non testé |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------|----------|------------|---|---|-----|------|----|--------------------|----|---|--|----------------|------------------|
| Marsouin commun | A04/1336 | 12/04/04 | Bray-Dunes | M | J | 117 | 25 | 23 | Bon état corporel | 2+ | vide | hématomes sous cutanés, parasitose légère, œdème et congestion pulmonaire | capture | Négatif |
| Marsouin commun | A04/1338 | ?/04/04 | Calais | M | J | 103 | 19 | 18 | Bon état corporel | 3 | otolithes | parasitose gastrique, congestion et œdème pulmonaires | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A03/1353 | 21/03/03 | Zuydcoote | F | J | 119 | 25 | 14 | Emaciation modérée | 3 | contenu alimentaire | congestion pulmonaire, émaciation, lacérations cutanées péri-mortem | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A09/1374 | 07/09/09 | Dunkerque | M | J | 88 | 9,5 | 8 | Emaciation sévère | 2 | quelques otolithes | émaciation, empreintes de filets, hématome sous-cutané intermandibulaire, splénomégalie, congestion et œdème pulmonaire sévère, mousse hémorragique abondante dans les voies respiratoires | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A08/1409 | 26/07/07 | Hardelot | M | J | 107 | 18,5 | 7 | Emaciation modérée | 2 | abondant, récent | pas de lésions significatives | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A09/1438 | 29/11/09 | Dunkerque | F | A | 169 | 55,5 | 24 | Bon état corporel | 2 | quelques otolithes et un bec de céphalopode | empreintes de filets, hyphéma, périangiocholite chronique, hépatite aiguë, infestation parasitaire modérée dans le cœur/ voies respiratoires/ vaisseaux pulmonaires, congestion et œdème pulmonaire sévère, pneumonie chronique multifocale, pétéchies méningées | capture | Positif |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------|----------|-----------|----|---|-----|------|----|--------------------|----|--------------------|---|----------------|------------------|
| Marsouin commun | A09/1494 | ?/?/09 | ND | M | J | 105 | 18,5 | 10 | Emaciation modérée | 2 | abondant, récent | hyphéma, empreintes de filets, hémopéricarde, abcès thoraciques, congestion et œdème pulmonaire sévère, mousse hémorragique dans les voies respiratoires, emphysème pulmonaire, congestion et hémorragies méningées | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A06/1499 | 20/04/06 | Dunkerque | ND | J | 120 | 30 | 30 | Bon état corporel | 3 | ND | hématomes sous-cutanés (cou, scapula, mâchoire inférieure), congestion et œdème pulmonaire, mousse hémorragique dans les voies respiratoires, parasitose faible dans le cœur et les oreilles, fracture de la mâchoire inférieure, congestion méningée | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A06/1501 | 22/04/06 | Zuydcotte | M | J | 95 | 14,7 | 18 | Bon état corporel | 2+ | quelques otolithes | congestion et œdème pulmonaire sévère, mousse hémorragique dans les voies respiratoires, parasitose faible dans les voies respiratoires, parasitose sévère dans les oreilles | capture | Non testé |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------|----------|----------------|---|---|-----|------|----|-------------------|----|----------------------------|---|----------------------------|------------------|
| Marsouin commun | A06/1502 | 26/03/06 | Dunkerque | M | J | 128 | 34,4 | 26 | Bon état corporel | 2+ | récent et otolithes | hématomes sous-cutanés (mâchoire inférieure), congestion et œdème pulmonaire sévère, parasitose modérée dans les voies respiratoires | capture | Négatif |
| Marsouin commun | A06/1511 | 02/05/06 | Clipon | M | A | 143 | 42,5 | 24 | Bon état corporel | 3+ | récent et otolithes (382g) | aucune observation car putréfaction | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A03/1521 | 25/04/03 | Calais | M | J | 117 | 30 | 20 | Bon état corporel | 3 | arêtes et otolithes | hématomes sous-cutanés, congestion et œdème pulmonaire | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A06/1522 | 26/03/06 | Bray Dunes | F | J | 100 | 18,5 | 10 | Bon état corporel | 2+ | quelques otolithes | émaciation légère, congestion et œdème périlaryngé (au-dessus d'un hématome), hématome sous-cutané (cou), mousse hémorragique et caillots sanguins dans les voies respiratoires, congestion et œdème pulmonaire sévère, parasitose légère dans les oreilles | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A07/1682 | 06/04/07 | Bray-Dunes | M | J | 128 | 22,7 | 24 | Bon état corporel | 2 | récent et otolithes | hyphéma, empreintes de filets, congestion et œdème pulmonaire, hématomes mandibulaires | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A07/1684 | 30/03/07 | Leffrinckoucke | M | J | 116 | 22,4 | 15 | Emaciation légère | 4 | vide | hyphéma, congestion et œdème pulmonaire, hématomes mandibulaires | capture mais code 4 | Non testé |
| Marsouin commun | A07/1685 | 21/02/07 | Bray-Dunes | M | J | 112 | 21,5 | 22 | Bon état corporel | 2 | vide | hyphéma, empreintes de filets, congestion et œdème pulmonaire, hématomes mandibulaires | capture | Non testé |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------|----------|------------|---|---|-----|------|----|--------------------|---|----------------------------|---|----------------|------------------|
| Marsouin commun | A07/1693 | 26/03/07 | Loon | F | J | 116 | 26 | 30 | Bon état corporel | 2 | récent et otolithes | hyphéma, empreintes de filets, amputation, congestion et œdème pulmonaire, hématomes mandibulaires | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A05/1781 | 04/03/05 | Dunkerque | M | J | 106 | 27,2 | 28 | Bon état corporel | 2 | vide | hématomes sous cutanés, congestion et œdème pulmonaire, infestation parasitaire sévère des voies respiratoires, pneumonie chronique nodulaire multifocale parasitaire, parasitisme des bulles tympaniques | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A05/1824 | 15/03/05 | Gravelines | F | J | 105 | 18,5 | 11 | Emaciation modérée | 2 | contenu alimentaire (66g) | cachexie légère, hypohéma bilatéral, empreintes filet, nageoire caudale partiellement amputée, hématomes sous-cutanés région intermandibulaire et congestion laryngée, congestion, œdème et emphysème pulmonaire, légère infestation parasitaire des bulles tympaniques | capture | Négatif |
| Marsouin commun | A05/1825 | 19/03/05 | Loon | M | J | 109 | 22,5 | 17 | Bon état corporel | 2 | contenu alimentaire (32 g) | hématomes sous cutanés en région mandibulaire, congestion laryngée, congestion et œdème pulmonaire, infestation parasitaire légère des voies respiratoires | capture | Non testé |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------|----------|-----------|---|---|-----|----|----|--------------------|---|---|--|----------------|------------------|
| Marsouin commun | A05/1826 | 07/03/05 | Dunkerque | F | J | 116 | 23 | 16 | Bon état corporel | 2 | peu de contenu alimentaire et otolithes | hypohéma bilatéral, lacérations cutanées superficielles et 1 profonde, hématomes sous cutanés tête et cou, congestion (péri)-laryngée, gastrite ulcérate chronique multifocale, emphysème pulmonaire, pneumonie chronique nodulaire parasitaire, pneumonie aiguë | capture | Négatif |
| Marsouin commun | A08/1847 | 19/02/07 | Dunkerque | M | J | 118 | 25 | 20 | Emaciation modérée | 3 | abondant, récent | empreintes de filets, hématomes mandibulaires, pétéchies dans la graisse, infestation parasitaire modérée dans les voies respiratoires/ventricule gauche/vaisseaux pulmonaires/poumon, infestation parasitaire légère dans l'estomac | capture | Non testé |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------|----------|-----------|---|---|-----|------|----|-------------------|----|---------------------|---|----------------------------|------------------|
| Marsouin commun | A09/1885 | 23/03/09 | Dunkerque | M | J | 123 | 28,5 | 20 | Bon état corporel | 2 | récent et otolithes | empreintes de filets, infestation parasitaire légère dans le premier estomac avec gastrite ulcéral, infestation de l'estomac 3 modérée par les trématodes avec gastrite nodulaire, infestation parasitaire modérée des canaux biliaires avec périangiocholite chronique, infestation parasitaire modérée dans les voies respiratoires, infestation parasitaire légère dans le ventricule gauche, congestion et oedème pulmonaire, mousse hémorragique dans les voies respiratoires, pneumonie multifocale chronique (kystes parasitaires) | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A09/1894 | 23/03/09 | Dunkerque | M | J | 120 | ND | 20 | Bon état corporel | 3 | vide | empreintes de filets, entérite aiguë hémorragique, infestation parasitaire modérée dans l'estomac 1, gastrite chronique nodulaire | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A09/1899 | ?/?/09 | ND | F | J | 117 | 26 | 32 | Bon état corporel | 4 | abondant, récent | infestation parasitaire modérée dans l'estomac | capture mais code 4 | Non testé |
| Marsouin commun | A09/1904 | ?/?/09 | ND | M | A | 135 | 41 | 20 | Bon état corporel | 3+ | abondant, récent | pas de lésions spécifiques | capture | Non testé |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------|----------|-----------|---|---|-----|------|----|-------------------|----|---------------------|---|----------------|------------------|
| Marsouin commun | A10/1962 | ?/?/10 | ND | F | J | 119 | 23 | 30 | Bon état corporel | 3 | récent | infestation parasitaire modérée dans les vaisseaux sanguins pulmonaires | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A10/1963 | ?/?/10 | ND | M | J | 116 | 24,5 | 22 | Bon état corporel | 2+ | quelques otolithes | multiples cicatrices sur la peau, multiples hématomes musculaires, cogestion et œdème pulmonaire, mousse dans les voies respiratoires | capture | Négatif |
| Marsouin commun | A10/2035 | ?/?/10 | ND | M | J | 124 | 34 | 30 | Bon état corporel | 2+ | few recent feeding | Deux coups de couteau profonds des deux côtés du cou avec des hémorragies musculaires et sous-cutanées, congestion et œdème pulmonaire sévère | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A09/2041 | 26/08/09 | ND | M | J | 109 | 22 | 30 | Bon état corporel | 2 | "lait" | hyphéma, empreintes de filets, congestion et œdème pulmonaire sévère, congestion laryngée | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A01/1155 | 18/06/01 | Dunkerque | M | J | 110 | 23 | 14 | Emaciation légère | 2 | vide | pas de lésions significatives | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A01/1196 | 27/04/01 | Loon | M | J | 104 | 22 | 22 | Bon état corporel | 3 | contenu alimentaire | pas de lésions significatives | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A01/932 | 22/04/01 | Calais | M | J | 106 | 23 | 24 | Bon état corporel | 2 | contenu alimentaire | pas de lésions significatives | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A04/017 | 21/03/03 | Dunkerque | M | J | 119 | 30 | 30 | Bon état corporel | 2 | ND | congestion et œdème pulmonaire | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A05/519 | 10/02/04 | Dunkerque | F | J | ND | ND | 40 | Bon état corporel | 2 | vide | nageoire sectionnée a-m, œdème pulmonaire, pneumonie chronique multifocale | capture | Non testé |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------|----------|------------|---|---|-----|----|----|--------------------|----|---------------------|---|----------------|------------------|
| Marsouin commun | A05/885 | 06/03/04 | Bray-Dunes | M | J | 122 | 31 | 20 | Bon état corporel | 2+ | contenu alimentaire | lacérations cutanées peri-mortem, congestion et oedème pulmonaires, infestation parasitaire légère | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A07/1064 | 11/12/06 | Dunkerque | F | A | 164 | 46 | 11 | Emaciation modérée | 2 | vide | lésions cutanées de type poxvirus, hématomes sous-cutanés (mâchoire inférieure et zone intermandibulaire), périangiocholite chronique et focale associée à des trématodes, mousse hémorragique abondante dans les voies respiratoires, infestation parasitaire modérée à sévère des voies respiratoires, congestion et oedème pulmonaire | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A07/898 | 29/11/06 | Zuydcotte | F | A | 155 | 56 | 8 | Emaciation sévère | 1 | récent et otolithes | émaciation sévère, hyphéma, lacérations cutanées et empreintes de filets, amputation partielle d'une nageoire, hématomes sous-cutanés de la mâchoire inférieure, pétéchies sous-cutanés, péritonite aiguë, tumeurs génitales, kystes thymiques, pétéchies pleuraux, congestion et oedème pulmonaire, sérosités dans les voies respiratoires | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A09/1165 | 19/09/08 | Zuidcoote | M | J | 114 | 20 | 22 | Bon état corporel | 3 | vide | pas de lésions significatives | capture | Non testé |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------|----------|-----------|---|---|-----|------|----|--------------------|----|---|---|----------------|----------------|
| Marsouin commun | A09/766 | 28/09/08 | Dunkerque | F | A | 140 | 33,5 | 20 | Bon état corporel | 2+ | abondant, récent, otolithes | empreintes de filets, hématomes sous-cutanés, hématome laryngé, important hématome mandibulaire associé à une fracture de la mâchoire inférieure, légère infestation parasitaire du ventricule droit, infestation parasitaire modérée des voies respiratoires, congestion de la graisse acoustique, congestion méningée, congestion et oedème pulmonaire sévère, mousse hémorragique dans les voies respiratoires | capture | Négatif |
| Marsouin commun | A10/1279 | ?/?/2010 | ND | M | J | 129 | 27 | 20 | Emaciation modérée | 3 | abondant mais seulement otolithes et arêtes de poissons | amputation de l'extrémité des nageoires, infestation parasitaire modérée de l'estomac 1, gastrite nodulaire focale chronique, mousse sérohémorragique dans les voies respiratoires, infestation parasitaire modérée dans les voies respiratoires | capture | Positif |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------|----------|----|---|---|-----|------|----|-------------------|----|--------------------|--|----------------|------------------|
| Marsouin commun | A11/1099 | ?/?/2010 | ND | F | J | 122 | 26,5 | 14 | Emaciation légère | 2 | abondant, récent | amputation de l'extrémité d'une nageoire, congestion et œdème pulmonaire sévère, mousse hémorragique abondante dans les voies respiratoires, hypertrophie des noeuds lymphatiques pulmonaires, poisson dans l'oesophage (tête dans l'estomac), infestation parasitaire modérée des vaisseaux pulmonaires | capture | Négatif |
| Marsouin commun | A12/1296 | ?/?/2011 | ND | M | J | 115 | 26,5 | 25 | Bon état corporel | 2 | quelques otolithes | hyphéma bilatéral, empreintes de filets, congestion voire hémorragie autour de la trachée, mousse séro-hémorragique abondant dans les voies respiratoires, congestion et œdème pulmonaire, congestion méningée | capture | Négatif |
| Marsouin commun | A13/1283 | ?/?/2013 | ND | M | J | 106 | 30 | 25 | Bon état corporel | 2+ | abondant, récent | périangiocholite chronique, gastrite chronique, congestion et œdème pulmonaire sévère, infestation parasitaire modérée dans les voies respiratoires, pneumonie modérée aiguë à chronique | capture | Négatif |
| Marsouin commun | A13/1284 | ?/?/2013 | ND | M | J | 113 | 23 | 25 | Bon état corporel | 2+ | récent | lacérations cutanées, pas d'observation (thorax ouvert) | capture | Non testé |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------|----------|----|----|---|-----|------|----|-------------------|----|-----------------------------|---|----------------|------------------|
| Marsouin commun | A13/1934 | ?/?/2013 | ND | M | J | 105 | 22,5 | 22 | Bon état corporel | 2+ | abondant, récent | empreintes de filets, pétéchies dans la graisse, hématomes sous-cutanés, congestion et œdème pulmonaire sévère | capture | Négatif |
| Marsouin commun | A13/2078 | ?/?/2013 | ND | M | J | 102 | 21,2 | 45 | Bon état corporel | 2 | abondant, récent | empreintes de filets, hyphéma, hématomes sous-cutanés, congestion et œdème pulmonaire sévère | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A13/2086 | ?/?/2013 | ND | F | J | 105 | 17,8 | 19 | Bon état corporel | 2 | ND | empreintes de filets, infestation parasitaire légère dans les voies respiratoires, congestion et œdème pulmonaire sévère | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A13/2098 | ?/?/2013 | ND | F | J | 120 | 28 | 21 | Emaciation légère | 2 | abondant, récent, otolithes | empreintes de filets, hématomes sous-cutanés, hématome périlaryngé, congestion et œdème pulmonaire sévère | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A13/2104 | ?/?/2013 | ND | M | J | 114 | 26 | 5 | Emaciation sévère | 2+ | ND | éventration au couteau, congestion et œdème pulmonaire | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A13/2116 | ?/?/2013 | ND | ND | J | 102 | 17 | 22 | Bon état corporel | 3 | récent | empreintes de filets, congestion et œdème pulmonaire sévère | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A13/2129 | ?/?/2013 | ND | F | J | 120 | 25 | 20 | Bon état corporel | 3 | quelques otolithes | empreintes de filets, hématomes sous-cutanés, congestion et œdème pulmonaire sévère, mousse hémorragique abondante dans les voies respiratoires | capture | Non testé |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------|----------|----------------|---|---|------|------|-----|-------------------|----|----------------------|--|----------------------------|------------------|
| Marsouin commun | A14/348 | ?/?/2014 | ND | F | J | 122 | 28 | 29 | Bon état corporel | 2+ | quelques otolithes | empreintes de filets, hyphéma, hématomes sous-cutanés, splénomégalie, congestion et œdème pulmonaire sévère, mousse hémorragique abondante dans les voies respiratoires | capture | Négatif |
| Marsouin commun | A97/850 | 06/03/97 | Calais | F | J | 125 | 38,5 | 35 | Bon état corporel | 2 | contenu alimentaire | pas de lésions significatives | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A99/1041 | 21/04/99 | Tréport | M | J | 103 | 15,5 | 8 | Emaciation sévère | 2 | vide | pas de lésions significatives | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A99/939 | 27/03/99 | Dunkerque | M | J | 114 | 22,3 | 21 | Bon état corporel | 3 | otolithes | pas de lésions significatives | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A13/1023 | 10/01/13 | Malo les Bains | M | J | >125 | 32 | >15 | Bon état corporel | 4 | abondant, récent | congestion et œdème pulmonaire, putréfaction avancée | capture mais code 4 | Non testé |
| Marsouin commun | A13/1931 | ?/?/2013 | ND | M | J | 102 | 16,5 | 18 | Bon état corporel | 2+ | peu abondant, récent | hématomes sous-cutanés, congestion et œdème pulmonaire sévère | capture | Négatif |
| Marsouin commun | A13/1932 | ?/?/2013 | ND | F | J | 106 | 18,5 | 18 | Bon état corporel | 2+ | vide | lacérations cutanées, empreintes de filets, pétéchies sous-cutanées, splénomégalie, congestion et œdème pulmonaire sévère, infestation parasitaire légère des voies respiratoires et des vaisseaux pulmonaires | capture | Négatif |
| Marsouin commun | A13/1933 | ?/?/2013 | ND | M | J | 112 | 20 | 20 | Bon état corporel | 2+ | très peu | empreintes de filets, hématomes sous-cutanés, congestion et œdème pulmonaire sévère, infestation parasitaire légère dans les voies respiratoires | capture | Négatif |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------|----------|----|---|---|-----|------|----|-------------------|----|----------------------|--|---------|-----------|
| Marsouin commun | A13/1938 | ?/?/2013 | ND | M | J | 108 | 21 | 28 | Bon état corporel | 2+ | peu abondant, récent | hématomes sous-cutanés, congestion et œdème pulmonaire sévère | capture | Négatif |
| Marsouin commun | A13/2065 | ?/?/2013 | ND | M | J | 100 | 18 | 16 | Bon état corporel | 2+ | vide | empreintes par les filets, infestation parasitaire légère de l'estomac 1, congestion et œdème pulmonaire sévère | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A13/2091 | ?/?/2013 | ND | M | J | 119 | 28,5 | 20 | Bon état corporel | 3 | abondant, récent | empreintes de filets, pneumonie nodulaire multifocale chronique, œdème pulmonaire | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A13/2099 | ?/?/2013 | ND | M | J | 107 | 17,5 | 16 | Bon état corporel | 3 | vide | empreintes de filets, congestion et œdème pulmonaire, infestation parasitaire modérée dans les voies respiratoires | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A13/2131 | ?/?/2013 | ND | M | A | 148 | 46 | 20 | Bon état corporel | 3 | abondant, récent | infestation parasitaire modérée dans les voies respiratoires, congestion et œdème pulmonaire sévère | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A14/329 | ?/?/2014 | ND | F | J | 108 | 24 | 25 | Bon état corporel | 2+ | peu abondant, récent | hyphéma, liquide hémorragique coulant de l'évent, hématome sur la tête, mousse hémorragique abondante dans les voies respiratoires, congestion et œdème pulmonaire | capture | Négatif |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------|----------|------------|---|----|-----|------|----|-------------------|----|---------------------------------|---|-------------------|------------------|
| Marsouin commun | A14/337 | ?/?/2014 | ND | F | J | 120 | 23,6 | 21 | Bon état corporel | 2 | vide | hématomes sous-cutanés, empreintes de filets, hyphéma, congestion et œdème pulmonaire sévère, mousse hémorragique importante dans les voies respiratoires | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A01/1127 | 02/06/01 | Hardelot | M | NB | 74 | 6,5 | 4 | Emaciation sévère | 3 | vide | émaciation sévère | émaciation | Non testé |
| Marsouin commun | A01/522 | 07/01/01 | Auhie | F | J | 118 | 19 | 5 | Emaciation sévère | 2 | vide | émaciation sévère | émaciation | Non testé |
| Marsouin commun | A02/1285 | 24/06/02 | Calais | M | J | 92 | 8 | 4 | Emaciation sévère | 3 | vide | émaciation sévère, congestion et œdème pulmonaire | émaciation | Négatif |
| Marsouin commun | A03/049 | 11/07/02 | Bray-dunes | M | A | 90 | 10 | 6 | Emaciation sévère | 2 | vide | émaciation sévère | émaciation | Non testé |
| Marsouin commun | A09/876 | 29/08/08 | Dunkerque | F | A | 154 | 35 | 8 | Emaciation sévère | 2 | très peu d'otolithes | émaciation sévère | émaciation | Non testé |
| Marsouin commun | A13/1930 | ?/?/2013 | ND | M | J | 110 | 17,5 | 6 | Emaciation sévère | 2+ | très peu de contenu alimentaire | émaciation sévère, hyphéma bilatéral, ulcère cutané chronique et oedémateux, oesophagite ulcérate aiguë, congestion et œdème pulmonaire sévère, infestation parasitaire modérée du ventricule gauche et des vaisseaux pulmonaires | émaciation | Non testé |
| Marsouin commun | A13/2085 | ?/?/2013 | ND | M | J | 106 | 15 | 5 | Emaciation sévère | 3 | vide | émaciation sévère, hématomes sous-cutanés, congestion et œdème pulmonaire sévère | émaciation | Non testé |
| Marsouin commun | A13/2088 | ?/?/2013 | ND | F | J | 112 | 17 | 11 | Emaciation sévère | 2 | vide | émaciation sévère, congestion et œdème pulmonaire sévère | émaciation | Non testé |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------|----------|--------|---|----|-----|------|----|-------------------|---|--------------------|---|-------------------|------------------|
| Marsouin commun | A14/309 | 26/06/13 | ND | M | NB | 88 | 10 | 1 | Emaciation légère | 2 | vide | dents pas encore sorties, hématomes sous-cutanés, écoulement sanguinolent de la bouche, lipidose hépatique, gastrite ulcéralive discrète, méléna, œdème aiguë du poumon, congestion pulmonaire, mousse sérohémorragique dans les voies respiratoires | émaciation | Non testé |
| Marsouin commun | A12/1327 | ?/?/2011 | ND | M | A | 127 | 28 | 19 | Bon état corporel | 3 | quelques otolithes | hématomes sous-cutanés, infestation parasitaire modérée de l'estomac, oesophagite nodulaire chronique, hépatomégalie, infestation parasitaire modérée dans les voies respiratoires, mousse sérohémorragiques dans les voies respiratoires, pneumonie, gastrite nodulaire chronique associée à des nématodes | infection | Négatif |
| Marsouin commun | A12/1328 | ?/?/2011 | ND | M | J | 114 | 25,5 | 19 | Bon état corporel | 3 | abondant, récent | lipidose hépatique, œdème pulmonaire, infestation parasitaire modérée dans les voies respiratoires et les vaisseaux pulmonaires, pneumonie chronique, thromboembolie pulmonaire | infection | Négatif |
| Marsouin commun | A04/1337 | ?/04/04 | Calais | F | J | 101 | 15 | 8 | Emaciation sévère | 3 | vide | émaciation, parasitose sévère, pneumonie hémorragique | infection | Non testé |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------|----------|-----------|---|---|-----|------|----|-------------------|----|--------------------|--|------------------------------|------------------|
| Marsouin commun | A09/1379 | 08/08/09 | Oye-Plage | M | J | 103 | 11,5 | 2 | Emaciation sévère | 4 | quelques otolithes | émaciation, hématomes sous-cutanés, parasitose modérée dans les voies respiratoires, infestation parasitaire sévère du sinus pérympanique | infection mais code 4 | Non testé |
| Marsouin commun | A12/1381 | ?/?/11 | ND | F | J | 112 | 21,5 | 18 | Bon état corporel | 2 | quelques otolithes | ulcères cutanés, aspect cuit du foie, splénomégalie, sévère parasitose dans les voies respiratoires, pneumonie aiguë, mousse hémorragique abondante dans les voies respiratoires | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A06/1513 | 20/04/06 | Zuydcotte | M | A | 133 | 34,5 | 18 | Bon état corporel | 2+ | vide | pleurésie chronique étendue, pneumonie aiguë du poumon gauche, pneumonie chronique du poumon droit, micro-abcès pulmonaires multifocaux, mousse hémorragique dans les voies respiratoires, infestation parasitaire du cœur et des voies respiratoires, parasitose modérée des oreilles | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A03/1517 | 30/06/03 | Equihen | M | J | 128 | 21,5 | 8 | Emaciation sévère | 2 | vide | cachexie, parasitose, pneumonie chronique nodulaire | infection | Négatif |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------|----------|------------------|---|---|-----|------|----|--------------------|----|----------------------|---|------------------|------------------|
| Marsouin commun | A08/1852 | 21/08/07 | Bray-Dunes | M | J | 114 | 17,3 | 6 | Emaciation sévère | 3 | très peu d'otolithes | emaciation, subcutis and intermandibular hematoma, moderate nematode infestation in airways, blood vessels and stomach, focal chronic ulcer | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A08/1868 | 06/02/07 | Zuydcoote | F | A | 143 | 26,5 | 8 | Emaciation sévère | 2+ | vide | émaciation, tumeurs des neuds lymphatiques et métastases pulmonaires | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A09/1943 | 22/06/09 | Dunkerque | F | A | 148 | 41 | 13 | Emaciation sévère | 1 | vide | émaciation sévère, pétéchies dans le lard sous-cutané, anémie, oedème sous-cutané, hydrothorax, splénomégalie, polyadénomégalie, aspect cuit du foie et des reins, hémopéricarde, cardiomyopathie, pneumonie aiguë, mousse blanche abondante dans les voies respiratoires | infection | Positif |
| Marsouin commun | A10/1965 | ?/?/10 | ND | F | A | 172 | 46 | 22 | Emaciation sévère | 3 | vide | émaciation sévère, emphysème et œdème pulmonaire, pneumonie nodulaire multifocale chronique, infestation parasitaire modérée du ventricule gauche et des voies respiratoires | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A00/1019 | 15/02/00 | Mérimont | M | A | 150 | 38,5 | 9 | Emaciation sévère | 2 | vide | pneumonie aiguë | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A00/1020 | 26/01/00 | Banc d'Akkar | M | A | 134 | 32 | 8 | Emaciation sévère | 3 | vide | pneumonie aiguë | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A00/307 | 18/11/99 | Boulogne-sur-mer | M | A | 142 | 41 | 10 | Emaciation modérée | 2 | vide | pneumonie aiguë | infection | Non testé |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------|----------|----------------|---|---|-----|------|----|--------------------|-----|---------------------|--|------------------|------------------|
| Marsouin commun | A00/308 | 20/11/99 | Dunkerque | F | A | 151 | 42 | 10 | Emaciation modérée | 2 | vide | pneumonie aiguë | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A00/559 | 16/01/00 | Calais | M | A | 149 | 37 | 8 | Emaciation sévère | 2 | vide | pneumonie aiguë | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A00/568 | 14/12/99 | Dunkerque | M | A | 139 | 37,2 | 18 | Emaciation légère | 2 | vide | péritonite aiguë | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A01/1226 | 14/07/01 | Baie de somme | M | A | 143 | 45 | 12 | Emaciation modérée | 3 | vide | pneumonie aiguë | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A01/803 | 22/02/01 | Gravelines | F | A | 147 | 44 | 13 | Emaciation modérée | 2 | vide | pneumonie aiguë | infection | Négatif |
| Marsouin commun | A02/1286 | 10/04/02 | Calais | M | J | 105 | 17,2 | 14 | Emaciation légère | 3 | un poisson | cachexie, pneumonie, parasitose multiple | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A02/704 | 22/01/02 | Baie de Somme | M | A | 165 | 50 | 16 | Emaciation légère | 2 | vide | cachexie, pneumonie, parasitose multiple | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A02/742 | 01/02/02 | Sangatte | F | A | 161 | 50 | 13 | Emaciation légère | 2 | otolithes | cachexie, pneumonie, parasitose multiple | infection | Négatif |
| Marsouin commun | A03/050 | 27/08/02 | Digue du Braek | F | A | 164 | 54 | 14 | Emaciation légère | 3 | vide | cachexie, pneumonie, parasitose multiple | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A03/273 | 13/09/02 | Blériot | M | A | 145 | 30 | 9 | Emaciation sévère | 3-4 | otolithes | cachexie, pneumonie, parasitose multiple, péritonite aiguë | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A03/274 | 02/09/02 | Gravelines | F | A | 135 | 30 | 13 | Emaciation modérée | 3/4 | vide | cachexie, parasitose multiple | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A04/083 | 22/09/03 | Calais | F | A | 172 | 63 | 12 | Emaciation modérée | 2 | vide | cachexie, parasitose, pneumonie | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A04/1001 | 08/02/04 | Le Touquet | F | A | 150 | 38 | 15 | Emaciation modérée | 2 | arêtes de poissons | émaciation, parasitose légère | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A04/1021 | 08/02/04 | Blériot | M | J | 122 | 25 | 14 | Emaciation modérée | 2 | contenu alimentaire | émaciation, entérite, parasitose sévère, pneumonie avec emphysème, oesophagite ulcéral chronique | infection | Négatif |
| Marsouin commun | A04/315 | 05/04/03 | Bray-Dunes | M | J | 98 | 20 | 15 | Bon état corporel | 3 | otolithes | cachexie, parasitose, pneumonie | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A04/483 | 20/10/03 | Calais | M | J | 109 | 17,5 | 9 | Emaciation sévère | 1 | otolithes | cachexie, parasitose, pneumonie aiguë | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A04/914 | 14/01/04 | Nord | M | A | 139 | 41,5 | 17 | Emaciation légère | 2 | otolithes | parasitose, pneumonie | infection | Non testé |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------|----------|------------|---|---|-----|------|----|-------------------|----|---|--|------------------|------------------|
| Marsouin commun | A04/987 | 01/02/04 | Calais | F | J | 124 | 26 | 15 | Emaciation légère | 2 | arêtes de poissons | émaciation, parasitose sévère, pneumonie | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A05/884 | 10/02/04 | Dunkerque | F | J | 108 | 21 | 10 | Emaciation sévère | 2+ | vide | dermo-épidermite chronique ulcéraire, dégénérescence graisseuse, gastrite ulcéraire chronique multifocale parasitaire, méléna, pneumonie aiguë hémorragique nécrosante, parasitose multisystémique | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A05/886 | 11/02/04 | Dunkerque | F | J | 101 | 16,5 | 5 | Emaciation sévère | 2 | vide | cachexie, stomatite aiguë ulcéraire, entérite aiguë hémorragique, bronchopneumonie aiguë hémorragique parasitaire | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A06/014 | 07/02/05 | Bray-Dunes | M | J | 102 | 13 | 5 | Emaciation sévère | 2+ | vide | cachexie sévère, infestation parasitaire sévère (bronches, artère pulmonaire, estomac et bulles tympaniques), gastrite chronique ulcéraire | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A06/1107 | 02/05/06 | Dunkerque | M | A | 136 | 39,6 | 30 | Bon état corporel | 2 | vide | thromboembolie pulmonaire, parasitose sévère (voies respiratoires, vaisseaux sanguins pulmonaires, bulles tympaniques) | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A06/849 | 06/10/05 | Bray-Dunes | F | J | 118 | 23,7 | 9 | Emaciation sévère | 2+ | rare otolithes et un peu de contenu alimentaire | émaciation | infection | Non testé |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|----------------|----------|------------|---|---|-----|----|----|-------------------|---|-----------------------------|--|------------------|------------------|
| Marsouin commun | A06/851 | 27/12/05 | Bray-Dunes | F | A | 158 | 46 | 14 | Emaciation légère | 2 | contenu alimentaire (868 g) | abcès casséux dans l'estomac, parasitose multisystémique sévère, bronchopneumonie aiguë hémorragique | infection | Négatif |
| Marsouin commun | A07/937 | 09/12/05 | Dunkerque | M | J | 125 | 22 | 8 | Emaciation sévère | 2 | vide | ulcères cutanés aigus multifocaux, hépatite nodulaire chronique, pneumonie aiguë, kystes pulmonaires sous la plèvre, infestation parasitaire modérée dans les voies respiratoires/coeur/vaisseaux pulmonaires/bulles tympaniques, parasitose sévère dans les estomacs, mousse hémorragique dans les voies respiratoires, gastrite chronique ulcéralive | infection | Non testé |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------|----------|-----------|---|---|-----|------|----|--------------------|----|--|---|------------------|------------------|
| Marsouin commun | A10/1009 | 02/01/10 | Dunkerque | F | A | 145 | 39,5 | 18 | Emaciation modérée | 2 | quelques becs de céphalopodes et otolithes de poissons | splénomégalie, infestation parasitaire dans les estomacs 1 et 3, périangiocholite chronique, oesophagite ulcéralive aiguë multifocale, infestation parasitaire modérée dans l'artère et les vaisseaux pulmonaires, parasitose sévère dans les voies respiratoires et les sinus pérympaniques, mousse blanche abondante dans les voies respiratoires, pneumonie aiguë et pneumonie chronique multifocale | infection | Négatif |
| Marsouin commun | A10/1040 | ?/?/10 | ND | F | J | 115 | 17 | 2 | Emaciation sévère | 2+ | vide | ulcères aigus sur les lèvres, papillomes cutanés, ulcères cutanés chroniques, hématomes sous-cutanés, oesophagite ulcéralive aiguë multifocale, mousse hémorragique abondante dans les voies respiratoires, infestation parasitaire modérée dans les voies respiratoires/artère et vaisseaux pulmonaires, pneumonie aiguë | infection | Non testé |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------|--------|----|---|---|-----|------|----|-------------------|---|---------------|---|------------------|------------------|
| Marsouin commun | A12/1165 | ?/?/11 | ND | F | J | 112 | 14,1 | 3 | Emaciation sévère | 2 | few otolithes | ulcères cutanés aigus à chroniques, papillomes cutanés, hyphéma bilatéral, mélèna, infestation parasitaire sévère dans les voies respiratoires/ vaisseaux pulmonaires/sinus péritympaniques, mousse sérohémorragiques dans les voies respiratoires, infestation parasitaire modérée dans l'artère pulmonaire, pneumonie aiguë | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A12/1286 | ?/?/11 | ND | F | A | 162 | 50 | 23 | Emaciation légère | 2 | vide | pétéchies dans le lard, hyphéma bilatéral, aspect cuit du foie, kystes ovariens, contenu "caramel" dans les glandes mammaires, abcès utérus, kystes thymiques, parasitose légère des voies respiratoires, gastrite ulcération aiguë | infection | Non testé |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------|--------|----|---|---|-----|----|----|--------------------|---|---------------------------------|--|------------------|------------------|
| Marsouin commun | A12/485 | ?/?/11 | ND | F | A | 147 | 39 | 15 | Emaciation modérée | 3 | vide | émaciation, aspect gélatineux du tissu sous-cutané, péritonite fibrineuse à hémorragique aiguë, étérite hémorragique aiguë, périangiocholite chronique associée à des trématodes, femelle gestante, oesophagite ulcéralive, abcès pulmonaires avec contenu caséeux, infestation parasitaire des estomacs | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A13/1262 | ?/?/13 | ND | M | J | 114 | 21 | 13 | Emaciation modérée | 2 | peu abondant, récent, otolithes | péritonite aiguë focale, multiples points blancs sur le foie, infestation parasitaire modérée à sévère des voies respiratoires et des vaisseaux sanguins, pneumonie, thromboembolie pulmonaire | infection | Négatif |
| Marsouin commun | A13/1282 | ?/?/13 | ND | M | J | 119 | 21 | 13 | Emaciation sévère | 3 | vide | lacérations cutanées (phoques?), masse nécrotique sous-cutanée, splénomégalie, parasitose modérée à sévère des voies respiratoires et des vaisseaux sanguins, pneumonie | infection | Négatif |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------|--------|----|---|---|-----|----|----|--------------------|----|---------------------------------|--|------------------|------------------|
| Marsouin commun | A13/1285 | ?/?/13 | ND | F | A | 165 | 45 | 12 | Emaciation sévère | 2+ | peu abondant, récent, otolithes | émaciation sévère, hématomes sous-cutanés, contenu "caramel" dans les glandes mammaires, pétéchies dans le lard, gastrite sévère chronique, périangiocholite sévère chronique, congestion et oedème pulmonaire sévère, parasitose sévère dans les voies respiratoires et les vaisseaux sanguins, pneumonie aiguë | infection | Négatif |
| Marsouin commun | A13/1935 | ?/?/13 | ND | M | J | 114 | 24 | 21 | Bon état corporel | 2+ | quelques otolithes | hyphéma, pétéchies dans le lard, hématomes sous-cutanés, gastrite focale chronique, parasitose sévère dans les voies respiratoires et les vaisseaux pulmonaires, pneumonie aiguë à chronique, thrombi | infection | Positif |
| Marsouin commun | A13/2058 | ?/?/13 | ND | M | J | 118 | 19 | 15 | Emaciation sévère | 2+ | vide | émaciation sévère, hyphéma, large abcès sous-cutané, péricardite fibrineuse aiguë sévère | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A14/353 | ?/?/14 | ND | M | J | 103 | 15 | 7 | Emaciation modérée | 3 | abondant, récent | émaciation sévère, pneumonie aiguë hémorragique, parasitose sévère dans les voies respiratoires et les vaisseaux sanguins, thromboembolie pulmonaire | infection | Négatif |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------|----------|-----------|---|---|-----|------|----|--------------------|----|---------------------------------|---|------------------|------------------|
| Marsouin commun | A14/360 | ?/?/14 | ND | M | J | 115 | 24,4 | 10 | Emaciation légère | 3 | peu abondant, récent, otolithes | hématomes sous-cutanés, œdème intramusculaire, invagination intestinale avec entérite aiguë | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A14/715 | ?/?/14 | ND | M | J | 127 | 28 | 11 | Emaciation modérée | 2+ | vide | émaciation, hyphéma, entérite hémorragique aiguë, parasitose modérée à sévère dans les voies respiratoires, pneumonie chronique multifocale | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A95/929 | 16/05/95 | Blériot | F | J | 118 | 18 | 12 | Emaciation sévère | 2 | vide | pneumonie aiguë | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A97/967 | 27/04/97 | Dunkerque | M | J | 118 | 22 | 10 | Emaciation sévère | 2 | vide | pneumonie aiguë | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A98/356 | 07/12/97 | Equihen | M | A | 144 | 33 | 13 | Emaciation sévère | 2 | vide | pneumonie aiguë | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A98/357 | 07/12/97 | Dunkerque | M | J | 114 | 19,5 | 11 | Emaciation sévère | 3 | vide | pneumonie aiguë | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A99/1094 | 02/05/99 | Dunkerque | M | J | 108 | 15 | 8 | Emaciation sévère | 2 | vide | pneumonie aiguë | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A99/707 | 02/02/99 | Loon | F | A | 134 | 30 | 15 | Emaciation modérée | 2 | otolithes | pneumonie aiguë | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A12/388 | ?/?/11 | ND | F | J | 99 | 12,2 | 6 | Emaciation sévère | 2 | vide | émaciation, parasitose sévère dans les voies respiratoires/ventricule droit/vaisseaux pulmonaires | infection | Négatif |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------|----------|-----------|---|---|-----|----|----|--------------------|----|----------------------|--|-------------------|------------------|
| Marsouin commun | A13/1939 | ?/?/13 | ND | F | A | 154 | 50 | 15 | Emaciation légère | 2+ | vide | hyphéma, contenu "caramel" dans les glandes mammaires, pétéchies dans le lard, hématomes sous-cutanés, splénomégalie, aspect cuit du foie, parasitose modérée des voies respiratoires/ vaisseaux pulmonaires/ ventricule gauche, congestion et œdème pulmonaire sévère | infection | Négatif |
| Marsouin commun | A12/1329 | ?/?/11 | ND | F | A | 161 | 49 | 19 | Emaciation modérée | 3 | beaucoup d'otolithes | lacérations cutanés, œdème pulmonaires sévère, mousse sérohémorragique dans les voies respiratoires, parasitose dans les voies respiratoires | capture | Négatif |
| Marsouin commun | A07/1690 | 02/03/07 | Dunkerque | F | J | 120 | 19 | 8 | Emaciation sévère | 2 | vide | émaciation, hyphéma, congestion et œdème pulmonaire, ongestion périlaryngée | émaciation | Non testé |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------|--------|----|---|---|-----|------|----|--------------------|----|---|---|-------------------------|------------------|
| Marsouin commun | A10/1306 | ?/?/10 | ND | M | J | 120 | 21,5 | 12 | Emaciation moyenne | 2+ | abondant mais seulement otolithes et arêtes de poissons | émaciation intermédiaire, hyphéma, splénomégalie, gastrite chronique ulcéralive multifocale, infestation parasitaire modérée dans les estomacs, décoloration hépatique, mousse sérohémostatique abondante dans les voies respiratoires, congestion et œdème pulmonaire, parasitose modérée dans les voies respiratoires et les vaisseaux pulmonaires | œdème pulmonaire | Non testé |
| Marsouin commun | A12/484 | ?/?/11 | ND | F | A | 158 | 54 | 8 | Emaciation sévère | 2 | vide | émaciation, hyphéma, hémorragie intermandibulaire, kystes hépatiques chroniques avec bile, congestion et hémorragie périlaryngée, mousse hémorragique abondante dans les voies respiratoires, pneumonie chronique, adénomégalie pulmonaire, congestion et œdème pulmonaire, parasitose modérée dans les voies respiratoires et les vaisseaux sanguins, oesophagite ulcéralive | émaciation | Négatif |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------|----------|-----------|---|---|-----|------|----|--------------------|----|----------------------------|--|-------------------------|----------------|
| Marsouin commun | A13/1002 | 27/01/13 | Le Portel | M | J | 105 | 19,5 | 23 | Bon état corporel | 2 | abondant, récent | marques de prédation par les phoques?, hyphéma bilatéral, congestion et œdème pulmonaire sévère, mousse abondante dans les voies respiratoires, otolithes dans la bouche et l'œsophage | œdème pulmonaire | Négatif |
| Marsouin commun | A13/1936 | | ND | M | J | 112 | 21,5 | 22 | Bon état corporel | 2+ | abondant, récent | marques de prédation par les phoques?, hématomes sous-cutanés, congestion et œdème pulmonaire sévère | œdème pulmonaire | Négatif |
| Marsouin commun | A13/1937 | ??/13 | ND | M | J | 94 | 16 | 23 | Bon état corporel | 2+ | peu abondant, récent | marques de prédation par les phoques?, hématomes sous-cutanés, congestion et œdème pulmonaire sévère | œdème pulmonaire | Négatif |
| Marsouin commun | A14/714 | ??/14 | ND | F | J | 103 | 17 | 15 | Emaciation moyenne | 2+ | peu de contenu alimentaire | hyperplasie cutanée multifocale, congestion modérée et œdème sévère pulmonaire, mousse hémorragique abondante dans les voies respiratoires | œdème pulmonaire | Négatif |
| Marsouin commun | A12/371 | ??/11 | ND | F | J | 113 | 14,5 | 6 | Emaciation sévère | 3 | vide | émaciation, ulcères aigus cutanés, œdème sous-cutané, oesophagite ulcéraire, mousse hémorragique abondante dans les voies respiratoires, parasitose sévère dans l'artère pulmonaire, parasitose modérée dans les voies respiratoires | infection | Négatif |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|--------------------|----------|---------------|---|--------|-----|------|----|--------------------|----|--------------------------------|---|----------------------------------|------------------|
| Marsouin commun | A06/1509 | 22/04/06 | Zuydcoote | M | J | 100 | 16 | 15 | Bon état corporel | 3+ | quelques otolithes | putréfaction avancée | ND | Non testé |
| Marsouin commun | A07/1605 | 21/02/07 | Bray-Dunes | M | J | 121 | 26,5 | 20 | Bon état corporel | 4 | ND | putréfaction avancée | ND | Non testé |
| Marsouin commun | A12/1284 | ?/?/11 | ND | M | J | 120 | 25 | 20 | Bon état corporel | 2+ | abondant (poissons), otolithes | hématomes sous-cutanés, parasitose modérée dans l'artère pulmonaire, pneumonie chronique, parasitose modérée dans les voies respiratoires | ND | Non testé |
| Marsouin commun | A13/2101ter | ?/?/13 | ND | F | J | 113 | 21,5 | 21 | Bon état corporel | 3 | few otolithe | congestion et œdème pulmonaire | ND | Non testé |
| Marsouin commun | A13/2115 | ?/?/13 | ND | F | J | 100 | 13 | 10 | Emaciation sévère | 4 | Abundant recent | sécère emaciation maus putréfaction avancée | ND | Non testé |
| Marsouin commun | A99/? | 15/04/99 | Baie de somme | F | J | 110 | ND | 7 | Emaciation sévère | 2 | contenu alimentaire | pas de lésions significatives | ND | Non testé |
| Marsouin commun | A10/2024 | ?/?/10 | ND | M | NB | 50 | 4,5 | 0 | Emaciation sévère | 4 | vide | émaciation | émaciation mais code 4 | Non testé |
| Marsouin commun | A12/1326 | ?/?/11 | ND | F | J | 110 | 24,5 | 21 | Bon état corporel | 2 | peu abondant, récent | morsures de phoques?, mousse sérohémorragique dans les voies respiratoires, oesophagite ulcéralive avec des nématodes, congestion et œdème pulmonaire, parasitose sévère dans les voies respiratoires | Prédation par les phoques | Négatif |
| Marsouin commun | A14/330 | ?/?/14 | ND | M | NB | 80 | 8 | 10 | Emaciation moyenne | 3 | vide | mort-né, cordon ombilical | mort-né | Non testé |
| Marsouin commun | A11/1100 | ?/?/10 | ND | M | NB | 73 | 5,5 | 5 | Emaciation sévère | 4 | vide | atélectasie pulmonaire | mort-né | Non testé |
| Marsouin commun | A13/1939bis | ?/?/13 | ND | M | foetus | 80 | 6,5 | 12 | | 2+ | vide | foetus (female A13/1939) | foetus (femelle A13/1939) | Non testé |
| Marsouin commun | A14/369 | ?/?/14 | ND | M | J | 106 | 20,1 | 23 | Bon état corporel | 2+ | peu abondant, récent | congestion et œdème plmonaire sévère, mousse sérohémorragique dans les voies respiratoires | capture | Non testé |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|----------------|-------|----|----|---|-----|------|----|--------------------|----|------------------|---|------------------|------------------|
| Marsouin commun | A14/370 | ??/14 | ND | ND | J | 112 | 21,5 | 18 | Bon état corporel | 2+ | abondant, récent | empreintes de filets, ulcères lèvre gauche, congestion et œdème pulmonaire, congestion à hémorragie périlaryngée | capture | Non testé |
| Marsouin commun | A14/371 | ??/14 | ND | F | J | 115 | 25 | 25 | Bon état corporel | 2 | abondant, récent | mâchoire inférieure ouverte, parasitose sévère, pneumonie | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A14/367 | ??/14 | ND | F | J | 121 | 20 | 7 | Emaciation sévère | 2+ | vide | lésions cutanées poxvirus, ulcères entre les nageoires pectorales, hyphéma bilatéral, hémorragie et œdème sur le cou à gauche, hémorragie mâchoire inférieure, parasitose sévère dans les voies respiratoires et le ventricule droit, pleurésie, pneumonie, infarctus, noeud lymphatique bronchial hypertrophié | infection | Non testé |
| Marsouin commun | A14/372 | ??/14 | ND | F | A | 151 | 41 | 10 | Emaciation modérée | 3 | otolithes | Large abcès chronique de 20 cm, sévère infestation parasitaire dans les voies respiratoires et les vaisseaux sanguins, mousse sérohémorragique dans les voies respiratoires | infection | Non testé |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------|----------|---------|---|---|-----|----|----|--------------------|---|------------------|--|--------------------------|------------------|
| Marsouin commun | A14/368 | ?/?/14 | ND | F | A | 168 | 52 | ND | Emaciation sévère | 3 | abondant | émaciation sévère, lésions cutanées de poxvirus, œdème sous-cutané, parasitose sévère dans le foie et les voies respiratoires, pneumonie, œdème pulmonaire, mousse hémorragique dans les voies respiratoires | émaciation | Non testé |
| Marsouin commun | A14/366 | ?/?/14 | ND | F | J | 136 | 34 | 20 | Emaciation modérée | 3 | abondant, récent | fracture de la mâchoire inférieure droite, parasitose sévère dans les voies respiratoires et les vaisseaux sanguins, multiples kystes parasitaires sous la plèvre | ND (infestation?) | Non testé |
| Dauphin commun | A13/1034 | 16/01/13 | Camiers | M | J | 175 | 53 | 12 | Emaciation modérée | 2 | peu abondant | hypoplasie de l'appareil génital: micropénis (30 m) et hypoplasie testiculaire (6cmx1,5cm), pétéchies dans le lard, anémie, décoloration musculaire, splénomégalie et pétéchies sur la rate, aspect hémorragique du thymus, ulcères chroniques focaux associés à des larves de nématodes dans l'estomac 1, ulcères dans l'estomac 2, mousse dans les voies respiratoires, congestion et œdème pulmonaire sévère, emphysème pulmonaire, pneumonie aiguë à chronique | infection | Positif |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|----------------|----------|--------|---|---|-----|------|----|--------------------|---|--|--|-----------|----------------|
| Lagénorhynque à bac blanc | A16/317 | 22/11/15 | Calais | F | A | 262 | 250 | 17 | Emaciation modérée | 1 | quelques rares otolithes et cristallins de poisson | <p> multiples érosions cutanées, ulcères chroniques bord de la langue, masse de tissu mou au plafond de l'arrière bouche, ictère, splénomégalie, aspect zébré du foie, légère parasitose gastrique, gastrite chronique diffuse, oesophagite pseudomembraneuse, congestion et oedème pulmonaire, mousse blanchâtre dans les voies respiratoires</p> | ND | Négatif |
| Globicéphale noir | A16/310 | 01/11/15 | Calais | F | A | ND | 1200 | 48 | Bon état corporel | 1 | vide | <p> dizaine de kystes de 8-10 mm dans le lard sous-cutané, dizaine de kystes parasitaires de 2-3 cm dans le péritoine, nodules parasitaires dans la muqueuse gastrique, légère parasitose gastrique, urines surcolorées avec flocons hémorragiques, congestion et oedème pulmonaire, mousse blanche dans les voies respiratoires, kyste à contenu blanc dans le médiastin, "stranding band necrosis" sur le myocarde</p> | ND | Négatif |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------|---------|----------|--------|---|---|----|------|----|-------------------|---|---|--|----|---------|
| Globicéphale noir | A16/311 | 01/11/15 | Calais | F | A | ND | 1200 | 44 | Bon état corporel | 1 | vide | ulcère cutané chronique de 20 cm au-dessus de la nageoire pectorale, dizaine de kystes de 8-10 mm dans le lard sous-cutané, dizaine de kystes parasitaires de 2-3 cm dans le péritoine, nodules parasitaires dans la muqueuse gastrique, ulcères chroniques gastriques, congestion et oedème pulmonaire, mousse blanche dans les voies respiratoires | ND | Négatif |
| Globicéphale noir | A16/312 | 01/11/15 | Calais | M | J | ND | 1200 | 46 | Bon état corporel | 1 | quelques otolithes et un bec de céphalopode | nématode dans l'aponévrose de l'oblique externe, dizaine de kystes de 8-10 mm dans le lard sous-cutané, dizaine de kystes parasitaires de 2-3 cm dans le péritoine, nodules parasitaires dans la muqueuse gastrique, congestion et oedème pulmonaire, mousse blanche dans les voies respiratoires | ND | Négatif |

| Espèce | Numéro d'autopsie | Date d'échouage | Lieu d'échouage | Sexe | Age | Longueur du corps (cm) | Poids corporel (kg) | Epaisseur de lard dorsal (mm) | Etat d'embonpoint | Code de conservation | Contenu stomacal | Lésions macroscopiques | Cause de la mort probable | RT-PCR Brucella |
|-------------------|-------------------|-----------------|-----------------|------|-----|------------------------|---------------------|-------------------------------|-------------------|----------------------|------------------|---|---------------------------|------------------|
| Phoque veau-marin | A01/886 | ?/?/01 | Bray-dunes | F | J | 120 | 31 | 30 | Bon état corporel | 2 | abondant, récent | emphysème, oedème et congestion pulmonaire | capture | Non testé |
| Phoque veau-marin | A05/899 | ?/?/04 | Dunkerque | M | J | 111 | 24,5 | 24 | Bon état corporel | 2 | vide | hyphéma, congestion et œdème pulmonaire, mousse hémorragique dans les voies respiratoires, ulcère gastrique focal chronique | capture | Non testé |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|----------------|--------|----|----|---|-----|----|----|-------------------|----|--------------------------------|---|----------------------------|------------------|
| Phoque veau-marine | A11/376 | ?/?/10 | ND | F | J | 129 | 36 | 45 | Bon état corporel | ND | aliments partiellement digérés | jetage nasal hémorragique bilatéral, lacérations sur les babines, hématomes sous-cutanés, congestion et hémorragie périlaryngée, congestion et mousse hémorragique des voies respiratoires, congestion et oedème pulmonaire, léger emphysème pulmonaire, contenu alimentaire dans les voies respiratoires | capture | Non testé |
| Phoque veau-marine | A11/323 | ?/?/10 | ND | F | J | 104 | 29 | 35 | Bon état corporel | 2 | abondant, récent | congestion et oedème pulmonaire, mousse hémorragique dans les voies respiratoires | capture | Non testé |
| Phoque veau-marine | A13/721 | ?/?/12 | ND | ND | J | 121 | 28 | 28 | Bon état corporel | 4 | abondant, récent | lacérations cutanées | capture mais code 4 | Non testé |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|-----------------|------|-----------|---|---|-----|------|----|--------------------|---|------------------|---|------------------|------------------|
| Phoque veau-marine | A13/623 | #### | Dunkerque | M | A | 130 | 74,3 | 18 | Bon état corporel | 2 | abondant, récent | griffes manquantes, multiples points blanc sur le foie, nématodes dans l'estomac, corps étranger dans l'estomac, œdème pulmonaire, leiomyome dans la vessie | capture | Non testé |
| Phoque veau-marine | A06/1106 | #### | Dunkerque | F | A | 150 | 50 | 20 | Emaciation modérée | 1 | abondant, récent | emphysème pulmonaire et médiastinal,, congestion et œdème pulmonaire, mousse blanche abondante dans les voies respiratoires | infection | Non testé |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|-----------------|--------|----|---|---|-----|------|----|--------------------|----|-------------------------|---|-------------------------|----------------|
| Phoque veau-marine | A11/1102 | ?/?/10 | ND | M | J | 103 | 15 | 15 | Emaciation modérée | 2+ | vide | estomac tubulaire, décoloration généralisée du foie, congestion et œdème pulmonaire, congestion sévère des voies respiratoires, sang digéré dans la bouche | œdème pulmonaire | Négatif |
| Phoque veau-marine | A10/1309 | ?/?/10 | ND | F | J | 102 | 26,6 | 35 | Bon état corporel | 2+ | abondant, récent (340g) | ulcère aigu sur le palais dur, pétéchies, congestion et hématomes sous-cutanés, infestation de nématodes modérée dans les voies respiratoires, mousse hémorragique dans les voies respiratoires, congestion et emphysème pulmonaire | capture | Négatif |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|-----------------|--------|----|---|---|-----|------|----|-------------------|----|-------------------------|---|-------------------|------------------|
| Phoque veau-marine | A10/1308 | ?/?/10 | ND | F | A | 140 | 44,5 | 31 | Emaciation légère | 2+ | abondant, récent (450g) | jetage nasal hémorragique bilatéral, congestion et hématomes sous-cutanés, multiples points blancs sur le foie, mousse hémorragique et congestion des voies respiratoires, congestion et œdème pulmonaire | capture | Négatif |
| Phoque veau-marine | A10/2047 | ?/?/10 | ND | M | J | 80 | 9,5 | 0 | Emaciation sévère | 2+ | vide | sévère émaciation, congestion et œdème pulmonaire sévère | émaciation | Non testé |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|-----------------|--------|------------|---|---|-----|-----|---|-------------------|---|----------------|--|-------------------|------------------|
| Phoque veau-marain | A05/1827 | ?/?/04 | Dunkerque | M | J | 100 | 11 | 1 | Emaciation sévère | 2 | rare otolithes | cachexie sévère, lacérations cutanées sur les lèvres, pétéchies sur la vessie, congestion et emphysème pulmonaire, œdème pulmonaire léger, stomatite ulcéral aiguë | émaciation | Non testé |
| Phoque veau-marain | A05/1851 | ?/?/05 | Calais | F | J | 96 | 8,4 | 0 | Emaciation sévère | 1 | vide | cachexie sévère, œdème sous-cutané, congestion et œdème pulmonaire | émaciation | Non testé |
| Phoque veau-marain | A06/1583 | #### | Authie Bay | M | A | 160 | 64 | 4 | Emaciation sévère | 1 | vide | émaciation, kérato-conjonctivite aiguë, congestion et œdème pulmonaire, liquide séreux en faible quantité dans les voies respiratoires | émaciation | Non testé |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|-----------------|--------|--------------------|---|---|----|------|----|-------------------|---|------|--|------------------|------------------|
| Phoque veau-marine | A06/1611 | #### | Calais | F | J | 82 | 11,5 | 4 | Emaciation sévère | 1 | vide | émaciation, conjonctivite aiguë, stomatite ulcérate aiguë, abcès aigu rétroorbitaire avec digitations dans le cou, estomac tubulaire | infection | Non testé |
| Phoque veau-marine | A13/316 | ?/?/12 | Centre Somme 12/09 | M | J | 97 | 14,5 | 10 | Emaciation sévère | 1 | vide | ulcères aigus sur les lèvres, stomatite aiguë ulcérate, abcès sous-cutané et phlegmon dans le cou, myosite aiguë dans le cou, estomac tubulaire, pétéchies sous-cutanés, polyadénomégalie, pneumonie aiguë | infection | Positif |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|----------------|--------|---------------------|---|---|----|------|---|-------------------|---|------|--|------------------|------------------|
| Phoque veau-marine | A13/348 | ?/?/12 | Centre Calais 15/09 | M | J | 95 | 13,5 | 3 | Emaciation sévère | 1 | vide | émaciation, stomatite aiguë ulcéralive, polyarthrite aiguë prurulente, pétéchies sous-cutanées, phlegmon sous-cutané dans le cou | infection | Non testé |
| Phoque veau-marine | A13/349 | ?/?/12 | Centre Calais | F | J | 95 | 10 | 0 | Emaciation sévère | 1 | vide | émaciation sévère, fistule oro-nasale (ulcère perforant aiguë), stomatite aiguë ulcéralive, estomac tubulaire, splénomégalie, pétéchies sous-cutanées, multiples points blancs sur le foie, emphysème pulmonaire focal | infection | Non testé |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------|-----------------|--------|------------------|---|---|-----|------|----|-------------------|---|---------------------|---|------------------|------------------|
| Phoque veau-marin | A10/1985 | #### | Dunkerque | F | J | 94 | 8 | 16 | Bon état corporel | 2 | vide | ictère sous-cutané généralisé, dégénération hépatique, congestion et ordème pulmonaire, ulcère aigu sur la langue | infection | Négatif |
| Phoque veau-marin | A00/506 | ?/?/00 | Calais | M | A | 137 | 35 | 20 | Bon état corporel | 2 | ND | Péritonite | infection | Non testé |
| Phoque veau-marin | A00/508 | ?/?/00 | Graveline | M | J | 95 | 13 | 0 | Emaciation sévère | 2 | vide | émaciation, pneumonie, hernie hiatale | infection | Non testé |
| Phoque veau-marin | A00/942 | ?/?/00 | Graveline | M | J | 121 | 25 | 28 | Bon état corporel | 2 | vide | congestion et oedème pulmonaire, pneumonie | infection | Non testé |
| Phoque veau-marin | A02/231 | #### | Boulogne-sur-Mer | F | J | 98 | 12,5 | 0 | Emaciation sévère | 2 | contenu alimentaire | sévère émaciation, emphysème pulmonaire, abcès sous la langue, pneumonie aiguë | infection | Non testé |
| Phoque veau-marin | A01/1223 | ?/?/01 | Baie de Somme | M | J | 95 | 9 | 0 | Emaciation sévère | 2 | vide | émaciation, entérite hémorragique | infection | Non testé |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------|-----------------|--------|------------------|---|---|-----|------|----|-------------------|----|------------------------------------|--|------------------|------------------|
| Phoque veau-marin | A02/1288 | #### | Calais | M | J | 118 | 24,3 | 20 | Emaciation légère | 2 | présence d'un morseau de plastique | bronchopneumonie aiguë, emphysème pulmonaire, infestation parasitaire modérée dans les voies respiratoires et l'estomac, multiples points blancs sur le foie | infection | Non testé |
| Phoque veau-marin | A03/521 | ?/?/02 | Dunkerque | F | J | 112 | 14,5 | 10 | Emaciation sévère | 3 | vide | emphysème pulmonaire et sous-cutané | infection | Non testé |
| Phoque veau-marin | A02/1330 | #### | Boulogne-sur-Mer | F | J | 96 | 10 | 0 | Emaciation sévère | 1 | vide | sévère émaciation, bronchopneumonie aiguë hémorragique | infection | Non testé |
| Phoque veau-marin | A03/097 | ?/?/02 | Normandie | M | J | 117 | 16 | 10 | Emaciation sévère | ND | vide | émaciation, emphysème pulmonaire | infection | Non testé |
| Phoque veau-marin | A02/1289 | #### | ND | M | J | 110 | 25 | 20 | Bon état corporel | 3 | abondant, récent | pétéchies dans la graisse sous-cutanée, entérite aiguë hémorragique | infection | Non testé |
| Phoque veau-marin | A03/1321 | ?/?/03 | Dunkerque | M | J | 102 | 22.3 | 18 | Emaciation légère | 1 | vide | pneumonie, emphysème pulmonaire | infection | Non testé |
| Phoque veau-marin | A04/484 | ?/?/04 | Calais | F | J | 100 | 12.5 | 4 | Emaciation sévère | 1 | vide | émaciation, parasitose, pneumonie | infection | Non testé |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|-----------------|--------|-----------|---|---|-----|----|---|-------------------|---|---------------------|---|------------------|------------------|
| Phoque veau-marine | A04/1699 | ?/?/04 | Calais | M | J | 120 | 22 | 2 | Emaciation sévère | 1 | contenu alimentaire | émaciation, épistaxis, pétéchies sur les nœuds lymphatiques et la rate, emphysème pulmonaire, pneumonie aiguë, mousse hémorragique dans les voies respiratoires, congestion méningée, congestion nasale | infection | Non testé |
| Phoque veau-marine | A08/692 | #### | Dunkerque | F | A | 145 | 39 | 2 | Emaciation sévère | 1 | contenu alimentaire | ulcères sur les lèvres, œdème sous-cutané, faible infestation de nématodes dans l'estomac, kystes rénaux et urétéraux, emphysème pulmonaire, congestion et œdème pulmonaire, pneumonie aiguë | infection | Négatif |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|-----------------|--------|--------------|---|---|-----|------|----|-------------------|---|------------------|---|------------------|------------------|
| Phoque veau-marine | A10/2043 | ?/?/10 | Dunkerque | F | J | ND | 23 | ND | Bon état corporel | 2 | vide | pneumonie aiguë hémorragique à purulente, emphysème pulmonaire, contenu muco-purulent dans les voies respiratoires, estomac tubulaire | infection | Non testé |
| Phoque veau-marine | A12/1995 | #### | Audresselles | F | J | 110 | 21,5 | 22 | Bon état corporel | 3 | abondant, récent | hématomes sous-cutanés, mucus dans la trachée, pneumonie aiguë | infection | Négatif |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------|-----------------|--------|--------|---|---|-----|------|----|--------------------|----|--------------------------|--|-------------------|------------------|
| Phoque veau-marin | A10/1039 | ?/?/10 | ND | M | J | 114 | 20,5 | 15 | Emaciation modérée | 2+ | abondant, récent (850 g) | épistaxis, hyphéma, gingivite périodontale, stomatite aiguë ulcéralive focale, œdème sous-cutané, hématomes sous-cutanés sur la tête, congestion périlaryngée et du thymus, congestion et oedème pulmonaire sévère, mousse hémorragique abondante dans les voies respiratoires, congestion des voies respiratoires | capture | Négatif |
| Phoque veau-marin | A10/2046 | ?/?/10 | ND | M | J | 90 | 10 | 0 | Emaciation sévère | 2+ | vide | severe emaciation, severe lung congestion and edema | emaciation | Non testé |
| Phoque veau-marin | A02/1294 | #### | Dannes | M | J | 100 | 17 | ND | ND | 4 | ND | putréfaction avancée | ND | Non testé |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------|-----------------|--------|-------------|---|---|------|------|----|-------------------|----|------------------|---|-------------------|------------------|
| Phoque veau-marin | A12/1232 | ?/?/11 | ND | F | J | 120 | 29 | 35 | Bon état corporel | 2 | rare otolithes | hyphéma bilatéral, hématomes intramusculaires, congestion et œdème pulmonaire, mousse hémorragique dans les voies respiratoires | capture | Non testé |
| Phoque veau-marin | A09/1167 | ?/?/09 | ND | F | J | 108 | 18 | 20 | Emaciation légère | 3 | abondant, récent | hématomes sous-cutanés mais putréfaction | capture | Non testé |
| Phoque veau-marin | A98/1322 | ?/?/98 | Dunkerque | F | J | 92,5 | 9 | 0 | Emaciation sévère | 3 | vide | émaciation sévère | émaciation | Non testé |
| Phoque veau-marin | A99/251 | ?/?/98 | Calais | M | J | ND | 11,5 | ND | Emaciation sévère | 3 | vide | émaciation sévère | émaciation | Non testé |
| Phoque veau-marin | A03/504 | ?/?/02 | Middelkerke | M | J | 112 | 19 | 8 | Emaciation sévère | ND | vide | bronchopneumonie aiguë, parasitisme multisystémique, emphysème pulmonaire, émaciation | infection | Non testé |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------|----------------|--------|----|---|---|-----|----|----|-------------------|----|--------|---|---------------------------------|------------------|
| Phoque veau-marin | A14/350 | ?/?/14 | ND | M | A | 146 | 42 | 20 | Emaciation légère | ND | récent | nœud lymphatique gastrite hypertrophique, congestion et œdème pulmonaire sévère, sole dans l'œsophage avec la tête coincée dans les choanes, congestion et hémorragie tête et cou, congestion marquée de l'encéphale | asphyxie par une poisson | Non testé |
|-------------------|----------------|--------|----|---|---|-----|----|----|-------------------|----|--------|---|---------------------------------|------------------|

| | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|----------------|--------|----------|---|---|-----|----|----|-------------------|----|------------------|---|----------------|------------------|
| Phoque veau-marine | A14/351 | ?/?/14 | ND | M | J | 124 | 30 | 22 | Emaciation légère | 3 | abondant, récent | mousse abondante hémorragique dans les voies respiratoires, emphysème pulmonaire, congestion et œdème pulmonaire, congestion de la tête, régurgitation d'une sole présente au fond de la bouche | capture | Non testé |
| Phoque veau-marine | A14/361 | ?/?/14 | Brau Dun | M | J | 113 | 30 | 23 | Bon état corporel | ND | abondant, récent | hypohémie bilatérale, congestion et œdème pulmonaire sévère, emphysème pulmonaire, mousse hémorragique abondante dans les voies respiratoires | capture | Négatif |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|----------------|--------|----|---|---|-----|----|----|-------------------|----|------------------|--|------------------|------------------|
| Phoque veau-marine | A14/356 | ?/?/14 | ND | M | A | 159 | 48 | 0 | Emaciation sévère | ND | vide | estomac tubulaire, quelques Anisakis dans l'estomac, sang en nature sortant de l'anus, pleurésie aiguë hémorragique à purulente, abcès sous l'œsophage de 10 cm de diamètre, épine plantée dans le muscle du plafond du thorax | infection | Non testé |
| Phoque veau-marine | A14/364 | ND | ND | M | A | 160 | 65 | 25 | Bon état corporel | ND | abondant, récent | jetage nasal hémorragique, hyphéma bilatéral, pétéchies dans la graisse sous-cutanée, congestion et œdème pulmonaire sévère, mousse hémorragique dans les voies respiratoires, congestion périlaryngée | capture | Négatif |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|-----------------|--------|-----------|---|---|-----|----|----|-------------------|---|------|---|------------------|------------------|
| Phoque veau-marine | A15/333 | ?/?/15 | ND | M | A | 155 | 70 | 10 | Emaciation sévère | 1 | vide | jetage hémorragique, ulcère aiguë lèvre inférieure, lacérations multiples, pétéchies lard sous-cutané, adénomégalie préscapulaire et bronchique, estomac tubulaire avec anisakis, mousse hémorragique abondante dans les voies respiratoires, pneumonie aiguë hémorragique lobes crâniens | infection | Non testé |
| Phoque gris | A03/1529 | ?/?/03 | Wiemereux | M | A | 130 | 30 | ND | ND | 4 | ND | putréfaction | ND | Non testé |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|-----------------|--------|----------------|---|---|-----|------|----|-------------------|---|---------------------------|---|---|------------------|
| Phoque gris | A07/1890 | #### | Leffrinckoucke | M | A | 250 | 250 | 40 | Bon état corporel | 2 | abondant, récent (6,6 kg) | emphysème pulmonaire, congestion et œdème pulmonaire, mousse hémorragique abondante dans les voies respiratoires, poisson dans la trachée | asphyxie par obstruction trachéale | Non testé |
| Phoque gris | A03/1064 | ?/?/03 | Dunkerque | F | J | 108 | 18 | 8 | Emaciation sévère | 1 | ND | cachexie, parasitose, pneumonie | infection | Non testé |
| Phoque gris | A12/1999 | ?/?/12 | ND | M | J | 114 | 19,7 | 9 | Emaciation sévère | 2 | abondant, récent | sévère émaciation, infestation de nématodes sévère dans les voies respiratoires, pneumonie aiguë, infestation sévère par des Halarachnidae dans les narines | infection | Positif |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|----------------|---------|----|---|---|-----|-----|---|-------------------|---|---|--|------------------------------|------------------|
| Phoque gris | A15/334 | ?/05/15 | ND | M | A | 210 | 120 | 8 | Emaciation sévère | 2 | abondant (500g), récent et quelques otolithes | hypohema bilatéral, jetage hémorragique bilatéral, thymus présent, congestion et œdème pulmonaire, mousse sérohémorragique abondante dans les voies respiratoires, congestion méningée | émaciation +/- trauma | Non testé |
|-------------|----------------|---------|----|---|---|-----|-----|---|-------------------|---|---|--|------------------------------|------------------|

NOM : BALIN

PRENOM : Allison

TITRE : La Brucellose chez les mammifères marins échoués sur les côtes françaises de la Manche de 1995 à nos jours : Enquêtes épidémiologique et anatomo-pathologique.

RESUME :

La brucellose est une zoonose majeure pouvant entraîner de lourdes conséquences en santé humaine et animale. Depuis les premiers cas de brucellose marine détectés chez les cétacés et les phoques échoués en 1994, un nombre croissant de *Brucella ceti* et *B. pinnipedialis* ont été rapportés, principalement sur la côte Nord-Est de l'Atlantique. Des cas de transmissions à l'homme sont également décrits, soulignant l'importance de suivre ces brucella marines en terme de santé publique. A l'heure actuelle, aucune donnée n'est disponible en France. L'auteur s'attarde ici à déterminer les causes d'échouages des mammifères marins échoués sur les côtes françaises de la Manche et, à partir de ces mêmes animaux, déterminer une prévalence ainsi que de potentielles lésions dues à *Brucella* chez ces mammifères marins.

Pour cela, une étude statistique des échouages entre 1995 et 2014 a été réalisée. Elle révèle d'une part que les deux causes de mortalités principales sont celles d'origine traumatique, représentée majoritairement par les captures accidentelles dans des engins de pêche et les causes infectieuses. D'autre part, de nouvelles causes de mortalité apparaissent avec l'émaciation sévère et la prédation inter-espèce. Pour l'ensemble des animaux autopsiés, 59 ont été retenus pour la recherche de *Brucella spp.* par réaction en chaîne par polymérase (PCR). La PCR a été positive pour 7 individus (11,86% (7/59)) parmi les 59 analysées. Des tests immunohistochimiques ont permis d'identifier la bactérie dans différents tissus et lésions, principalement la rate et les poumons. Enfin, le séquençage des produits de PCR a permis d'affirmer l'infection de 5 animaux (8,47% (5/59)), 2 étant des faux positifs. Notre étude révèle que la brucellose est présente sur nos côtes et peut représenter un risque en terme de santé publique. Un cas de méningoencéphalite chez un dauphin commun a été diagnostiqué, ce qui est une première mondiale. Cependant, une analyse critique de l'ensemble des résultats met finalement en avant des problèmes de sensibilité et spécificité des tests utilisés. Dès lors, le nombre de faux positifs et de faux négatifs apparaissent non négligeables. Il conviendrait ainsi de maintenir les recherches sur les causes de mortalités ainsi que d'identifier et de caractériser le potentiel infectieux et zoonotique des *Brucella* des mammifères marins en Europe.

MOTS-CLES : Brucellose – Mammifères marins – PCR – Immunohistochimie – Epidémiologie – Pathologie – Zoonose - Echouages

ABSTRACT :

Brucellosis, an important zoonosis, can have serious consequences on human and animal health. Since the first cases of brucellosis detected in stranded cetaceans and seals in 1994, a large number of *Brucella ceti* and *B. pinnipedialis* have been reported, mostly in the North-East Atlantic coastline. Naturally acquired infection in humans by a marine *Brucella* have been described, suggesting the importance of studying the prevalence of marine brucellae in terms of public health. Actually, no data is available in France. The author try here to specify the causes of stranding of marine mammals on the English channel coastline, and, with these same animals, determine the prevalence and *Brucella* lesions.

For this purpose, a statistical analysis about strandings between 1995 et 2014 has been done. It reveals that the main two causes of death identified were: traumatic associated with fishing net bycatch and infectious disease. However, new causes of mortality as severe emaciation and predation appear. Among these necropsied animals, 59 were investigated by real time polymerase chain reaction. The PCR was positive for 7 (11,86% (7/59)) of the 59 stranded animals (8,47% (5/59)). Under microscope, positive immunohistochemical staining was obtained in tissues, especially spleen and lungs. Finally, 2 marine mammals were false positive. Sequencing allows to confirm the infection by *Brucella* for 5 animals. Our study reveals the presence of *Brucella* in marine mammals along our coastline wich constitutes a biohazard for human health. As a first report in the world, a common

dolphin meningoencephalitis was diagnosed. However, a critical analysis of our global results shows the failings on the specificity and sensibility of our lab methods. So, false positive and negative are no negligible. This observation highlights the need for additional research on causes of strandings and the relevance of *Brucella* for marine hosts and their environment for the impact of public health.

KEY WORDS: Brucellosis – Marine mammals– PCR – Immunochemistry – Epidemiology – Pathology – Zoonosis - Strandings