

## Mémoire

**Auteur** : Lomba, Primaëlle

**Promoteur(s)** : Jauniaux, Thierry

**Faculté** : Faculté des Sciences

**Diplôme** : Master en océanographie, à finalité approfondie

**Année académique** : 2023-2024

**URI/URL** : <http://hdl.handle.net/2268.2/20557>

---

### *Avertissement à l'attention des usagers :*

*Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.*

*Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.*

---



Département de morphologie et pathologie  
(Faculté de Vétérinaire)

---

**Brucellose chez les mammifères marins :  
Le rôle potentiel des parasites respiratoires dans la  
transmission de la bactérie**

---

Réalisé par :

**LOMBA Primaëlle**

Supervisé par :

**Dr. JAUNIAUX Thierry**

Travail personnel de Fin d'Etudes

Année académique 2023-2024

Master 2 Océanographie

- *Mémoire* -

## REMERCIEMENTS

---

Tout d'abord, je tiens à remercier mon promoteur, Thierry Jauniaux, pour m'avoir donné l'opportunité d'explorer un sujet qui m'intéresse à travers ce mémoire. Je le remercie également pour les nombreuses occasions où j'ai pu participer activement aux autopsies en salle et en terrain, ainsi que pour ses réponses patientes à mes nombreuses questions.

Je souhaite enfin remercier Sophie Vroomen, la brillante technicienne de laboratoire du service. Grâce à son aide précieuse et sa patience, j'ai pu maîtriser mes manipulations laborantines. Sa bonne humeur et sa gentillesse permanentes m'ont été d'un grand soutien. De plus, sa rapidité à répondre à mes demandes a grandement facilité mes avancées dans mes travaux.

Je souhaite aussi exprimer ma gratitude à Germain Bonhomme pour sa précieuse assistance durant mon travail en laboratoire. Chaque fois qu'il percevait ma confusion ou mes hésitations, il se montrait toujours prêt à m'aider, éclaircissant avec patience les conduites et procédures à suivre en laboratoire.

Merci aussi à Fabien Ectors pour sa grande aide, sa disponibilité, sa patience et ses conseils qui ont grandement contribué à l'essor de mes compétences dans la manipulation et l'observation du monde microscopique.

Evidemment, je n'oublie pas Madeline Romnee, François Focroulle et Martin Lemaire que je remercie pour tous les moments de rire partagés et les connaissances précieuses en histopathologie qu'ils ont eu la gentillesse de me transmettre.

Je voudrais également associer à ces remerciements toute l'équipe du service de pathologie, dont la convivialité, l'accueil chaleureux et la gentillesse ont rendu mon expérience enrichissante et agréable.

Et surtout, je tiens à exprimer de tout cœur un immense merci à mes parents, à ma fratrie et à mon copain, qui m'ont soutenu tout au long de mes études universitaires. Bien-sûr, je remercie également tous mes amis qui ont contribué à rendre mes cinq années universitaires (bachelier et master) si joyeuses et mémorables.

## RÉSUMÉ

---

Depuis leur découverte en 1994, les *Brucella* spp. marines ont été isolées à partir d'une grande variété de mammifères marins. La souche *B. ceti* infecte les cétacés, alors que *B. pinnipedialis* se retrouve chez les pinnipèdes, bien que des infections croisées puissent survenir. Mis à part les avortements qu'elles peuvent provoquer, ces bactéries intracellulaires facultatives à Gram-négatif ne sont pas directement responsables de la mortalité de l'individu, mais peuvent provoquer des infections et des lésions dans divers organes, pouvant l'affaiblir. La transmission des *Brucella* spp. marines chez ces animaux n'est pas entièrement élucidée, mais il est prouvé qu'ils peuvent contracter la brucellose par transmission verticale, horizontale et vectorielle via des parasites, notamment des nématodes pulmonaires porteurs de la bactérie. Cette dernière voie implique de considérer le cycle de vie de ces vers, car les larves de premier stade, également susceptibles d'être infectées, peuvent contribuer à la transmission de *Brucella* spp. dans l'écosystème marin.

Cette étude vise alors à confirmer la transmission de *Brucella* spp. par les larves parasitaires pulmonaires chez les mammifères marins, en vérifiant si les larves de premier stade infestant les poumons des individus dont l'état brucellique est positif, sont également infectées par la bactérie.

Au total, les poumons de neuf individus d'intérêts (sept positifs et deux négatifs à la brucellose) ont été utilisés, à partir desquels des fragments ont été lavés pour récupérer un maximum de larves. Des étapes de concentration et de filtration ont permis de les isoler, facilitant ainsi leur pipetage. Par la suite, une PCR a été réalisée sur l'ADN extrait de ces larves afin de détecter la présence éventuelle de *Brucella* spp. et ainsi confirmer une éventuelle portance de l'infection.

Parmi les sept individus étudiés testés positifs pour la brucellose, quatre contiennent des larves probablement porteuses de *Brucella* spp. Toutefois, l'un des deux individus testés négatif pour la brucellose, présente des larves pulmonaires qui se sont révélées légèrement positives.

Les résultats obtenus dans cette étude soutiennent l'hypothèse de transmission vectorielle par les vers pulmonaires chez les mammifères marins, déjà évoquée par de nombreux auteurs. Cela permet alors de valider la méthodologie réalisée dans cette étude pour tenter de déterminer le rôle des nématodes pulmonaires dans la transmission des *Brucella* spp. marines dans l'écosystème marin, même si elle présente toutefois quelques limites.

## ABSTRACT

---

Since their discovery in 1994, marine *Brucella* spp. have been isolated from a wide variety of marine mammals. The *B. ceti* strain infects cetaceans, while *B. pinnipedialis* is found in pinnipeds, although cross-infections can occur. Apart from abortions they can cause, these Gram-negative facultative intracellular bacteria are not directly responsible for the death of the individual, but can cause infections and lesions in various organs, which can weaken the animal. The transmission of marine *Brucella* spp. in these animals has not been fully elucidated, but there is evidence that they can contract brucellosis by vertical, horizontal, and vectorial transmission via parasites, in particular pulmonary nematodes carrying the bacteria. The latter route involves considering the life cycle of these lungworms, as the first-stage larvae, which are also likely to be infected, can contribute to the transmission of *Brucella* spp. in the marine ecosystem.

The aim of this study is therefore to confirm the transmission of *Brucella* spp. by lungworm larvae in marine mammals, by checking whether the first-stage larvae infesting the lungs of brucellosis-positive individuals are also infected by the bacteria.

In total, the lungs of nine individuals of interest (seven positive and two negative for brucellosis) were used, from which fragments were washed to recover as many larvae as possible. The larvae were then concentrated and filtered, making them easier to pipette. A PCR was then carried out on the DNA extracted from these larvae to detect the possible presence of *Brucella* spp. and thus confirm a possible infection.

Of the seven individuals tested positive for brucellosis, four contained larvae probably carrying *Brucella* spp. However, one of the two individuals tested negative for brucellosis had pulmonary larvae that tested slightly positive.

The results obtained in this study support the hypothesis of vectorial transmission by lungworms in marine mammals, already mentioned by several authors. This validates the methodology used in this study to attempt to determine the role of pulmonary nematodes in the transmission of marine *Brucella* spp. in the marine ecosystem, although it does have some limitations.

## TABLE DES MATIÈRES

|   |           |
|---|-----------|
| Introduction bibliographique .....  | 7         |
| <b>1. Echouage des mammifères marins.....</b>   | <b>7</b>  |
| 1.1. Les différentes causes des échouages .....   | 9         |
| 1.1.1. Causes anthropiques .....  | 9         |
| 1.1.2. Causes naturelles.....   | 9         |
| 1.2. Les maladies bactériennes .....  | 9         |
| 1.2.1. <i>Brucella</i> spp. ....  | 10        |
| <b>2. La brucellose dans l'environnement marin .....</b>                                | <b>11</b> |
| 2.1. Distribution.....  | 11        |
| 2.2. Les <i>Brucella</i> spp. marines.....  | 11        |
| 2.2.1. Infection chez les mammifères marins .....                                       | 11        |
| 2.2.2. Lésions associées .....  | 12        |
| 2.2.3. Polyvalence infectieuse .....  | 13        |
| 2.3. Potentiel zoonotique .....   | 13        |
| 2.3.1. Contact direct .....   | 14        |
| 2.3.2. Contact indirect.....  | 14        |
| <b>3. Transmission de <i>Brucella</i> spp. chez les mammifères marins .....</b>         | <b>14</b> |
| 3.1. Transmission horizontale.....  | 15        |
| 3.2. Transmission verticale .....   | 15        |
| 3.3. Transmission vectorielle.....  | 15        |
| <b>4. Parasitisme par les nématodes pulmonaires .....</b>                               | <b>17</b> |
| 4.1. Voie d'entrée bactérienne secondaire .....   | 17        |
| 4.2. Lésions associées .....  | 17        |
| 4.3. Vers pulmonaires des pinnipèdes.....   | 18        |
| 4.3.1. <i>Parafilaroides</i> spp. ....  | 18        |
| 4.3.2. <i>Otostrongylus circumlitus</i> .....   | 18        |
| 4.4. Vers pulmonaires des cétacés.....  | 19        |
| 4.4.1. Pseudaliidae .....   | 19        |
| 4.5. Cycle de vie des vers pulmonaires chez les mammifères marins .....                 | 19        |
| 4.6. Portance de <i>Brucella</i> spp. par les vers pulmonaires.....                     | 22        |
| 4.6.1. Relation entre le cycle de vie des vers pulmonaires et <i>Brucella</i> spp. .... | 22        |
| 4.6.2. Renversement de perspective .....  | 23        |
| <b>5. Travaux précédemment réalisés .....</b>   | <b>24</b> |
| <b>6. Objectifs du travail .....</b>  | <b>25</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| Méthodologie.....   | 26        |
| <b>1. Protocole.....</b>  | <b>26</b> |
| 1) Récolte et lavage des fragments de poumons.....                                | 26        |
| 2) Concentration des larves .....   | 27        |
| 3) Isolement des larves par pipetage .....  | 28        |
| 4) Extraction ADN et PCR.....   | 29        |
| <b>2. Individus étudiés.....</b>  | <b>31</b> |
| 2.1. Caractéristiques des individus autopsiés.....                                | 34        |
| 2.2. Caractéristiques des individus des échantillons congelés .....               | 35        |
| Résultats.....  | 37        |
| <b>1. Larves des poumons des individus autopsiés .....</b>                        | <b>37</b> |
| <b>2. Larves des échantillons pulmonaires congelés .....</b>                      | <b>39</b> |
| Discussion.....   | 41        |
| <b>1. Positivité des larves chez les individus positifs à la brucellose .....</b> | <b>41</b> |
| <b>2. Positivité des larves chez l'individu négatif à la brucellose.....</b>      | <b>42</b> |
| <b>3. Négativité des larves chez les individus positifs à la brucellose .....</b> | <b>43</b> |
| <b>4. Limites de l'étude .....</b>  | <b>44</b> |
| 4.1. Nombre d'individus étudiés .....   | 44        |
| 4.2. Mode de conservation .....   | 44        |
| 4.2.1. Congélation.....   | 44        |
| 4.2.2. Ethanol glycériné .....  | 45        |
| 4.3. Biais provoqué par les débris cellulaires pulmonaires .....                  | 45        |
| 4.3.1. Pipetage des larves en deux temps.....                                     | 46        |
| 4.3.2. Immunohistochimie .....  | 47        |
| 4.3.3. Implication des larves dans l'utérus des nématodes femelles .....          | 47        |
| Conclusion (et perspectives).....   | 48        |
| Bibliographie.....  | 49        |
| Annexes.....  | 54        |

### 1. Echouage des mammifères marins

La France, possédant un littoral de 5000 km de long, enregistre en moyenne 2000 échouages de mammifères marins par an, et cela depuis près de 10 ans (Wund *et al.*, 2023), tandis que la Belgique, avec ses 68 km de côtes, en compte une centaine (Haelters et Kerckhof, 2023). Dans les régions côtières françaises bordées par la Manche et la Mer du Nord, les cas d'échouages de cétacés ont connu une augmentation progressive jusqu'aux années 2010 avec une année exceptionnelle en 2002 où 211 échouages ont été recensés (**Figure 1**). Dans cette zone, la majorité des cétacés qui s'échouent sont les Delphinidae ainsi que les Phocoenidae. Quelques Balaenopteridae, Physeteridae et Ziphiidae ont également été enregistrés, mais ceux-ci constituent une minorité des cas. En 2022, un orque et un beluga ont été retrouvés dans la Seine en Normandie où leur vie a pris fin. Bien que les échouages de cétacés semblent se stabiliser depuis quelques années, ils dépassent les 200 depuis 2012, avec deux pics remarquables en 2013 et 2016 provenant majoritairement d'échouages de marsouins communs (Phocoenidae) (**Figure 1**) (RNE, Observatoire Pelagis). Quant à la Belgique, la majorité des cétacés qui s'y échouent sont également des marsouins. Leur nombre d'échouage a considérablement augmenté depuis le début des années 2000, atteignant un pic en 2013 avec 150 marsouins échoués (**Figure 2**). En 2023, le nombre d'échouages de marsouins a enregistré son plus bas niveau de ces 20 dernières années (**Figure 2**). Cette même année, un épisode notable a été l'échouage d'une orque à La Panne, constituant le premier cas confirmé d'orque en Belgique au 21<sup>ème</sup> siècle (Haelters et Kerckhof, 2023).

En ce qui concerne les pinnipèdes, ce sont principalement les Phocidae qui sont impactés par les échouages au nord de la France. Effectivement, aucun Otariidae n'a été répertorié par le RNE (Réseau National des Echouages) depuis son existence, et seul un morse (Odobenidae) s'est échoué vivant en 2022 dans le port de Dieppe en Normandie, avant de retrouver l'eau. En revanche, les échouages des phoques sont en augmentation depuis les années 90, en particulier depuis 1995. Cette tendance s'est nettement accentuée après les années 2010, avec l'année 2021 enregistrant le plus grand nombre de phoques échoués (359) (**Figure 1**) (RNE, Observatoire Pelagis). En Belgique, les échouages des phoques augmentent progressivement depuis les années 2000, avec un pic remarquable en 2021 où 101 phoques morts ont été retrouvés (**Figure 2**) (Haelters *et al.*, 2021).

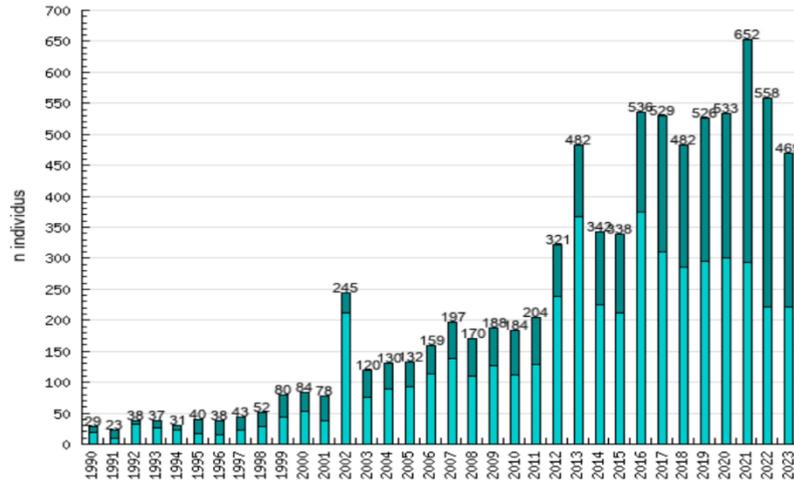


Figure 1 : Nombre de cétacés (bleu clair) et pinnipèdes (bleu foncé) échoués au Nord de la France (Manche et Mer du Nord) depuis 1990 (RNE, Observatoire Pelagis).

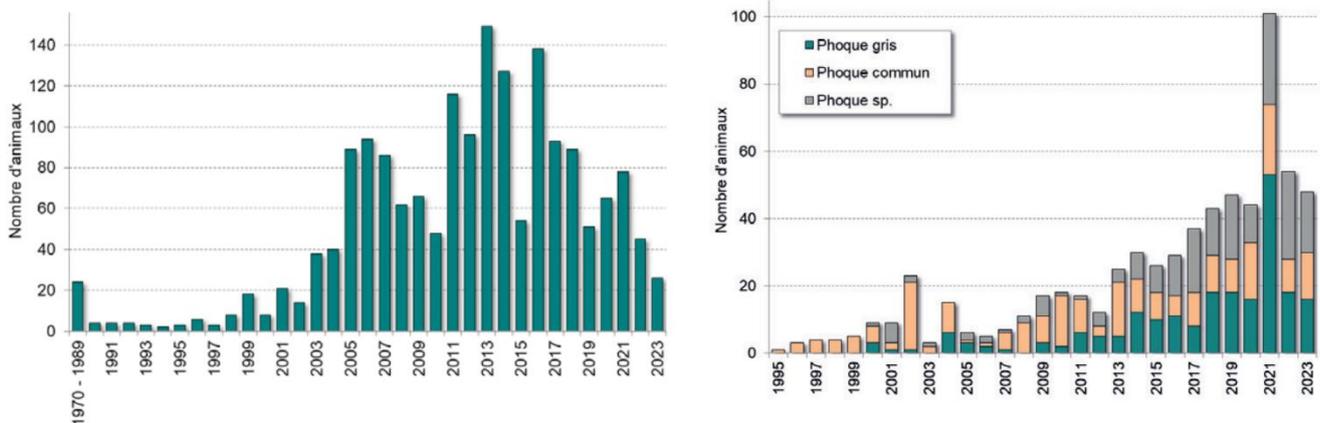


Figure 2 : Nombre de marsouins (graphique gauche) et de phoques (graphique droite) échoués en côte belge (Mer du Nord) depuis les années 90 (Haelters et Kerckhof, 2023).

Le suivi des échouages joue un rôle crucial dans la collecte de données essentielles pour orienter les efforts de conservation des mammifères marins. En effet, chaque échouage offre une opportunité d'identifier les menaces auxquelles sont confrontés ces animaux, grâce aux autopsies et aux analyses qui s'ensuivent. Ces investigations permettent également d'établir un suivi épidémiologique des populations de mammifères marins. Etant donné que ces mammifères peuvent être porteurs de pathologies émergentes et de zoonoses, maladies infectieuses transmissibles à l'homme, ces études revêtent une importance pour la santé humaine et animale. Ainsi, le suivi des échouages ne se limite pas à la préservation de la biodiversité marine ; il constitue également un pilier essentiel du concept « One Health », qui reconnaît l'interdépendance entre la santé des écosystèmes, des animaux et des êtres-humains (Wund *et al.*, 2023 ; RNE, Observatoire Pelagis).

## 1.1. Les différentes causes des échouages

Les échouages, aux origines variées, peuvent être provoqués tant directement qu'indirectement par l'activité humaine, mais peut également résulter de phénomènes naturels.

### 1.1.1. Causes anthropiques

L'une des principales causes de mortalité chez les mammifères marins est liée à l'activité de pêche. Cela concerne principalement les captures accidentelles (ou « by-catch »), mais également dans une moindre mesure, les collisions (Jauniaux, 2002 ; Observatoire Pelagis). La surpêche, entraînant une diminution importante des proies, contribue également à cette problématique en privant les individus de leur ressource alimentaire. Les pollutions sonore et chimique sont des facteurs contribuant à leur désorientation et au développement de pathologies respectivement, ce qui peut finalement entraîner leur échouage. A long terme, le changement climatique peut modifier les zones de répartition des proies, perturbant ainsi la chaîne alimentaire et affectant alors les mammifères marins, les prédateurs de haut niveau trophique (De Vere *et al.*, 2018 ; Observatoire Pelagis).

### 1.1.2. Causes naturelles

La mortalité dite « naturelle » permet aussi d'expliquer certains échouages, notamment à travers les prédatons interspécifiques voire intraspécifiques. Les maladies infectieuses, affaiblissant généralement les mammifères marins, sont provoquées par des agents pathogènes présents dans leur milieu marin, pouvant être de nature virale, fongique, parasitaire, ou encore bactérienne (Higgins, 2000 ; Sanderson et Alexander, 2020 ; Observatoire Pelagis).

## 1.2. Les maladies bactériennes

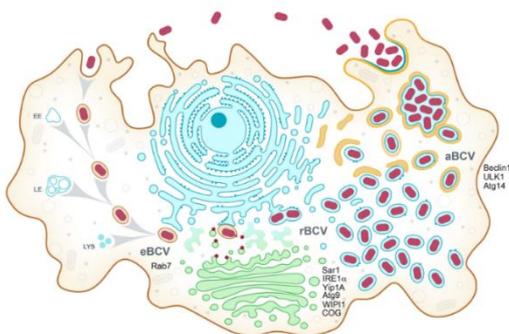
Les infections bactériennes, se développant généralement secondairement à des infections virales ou parasitaires, sont reconnues comme étant une des principales causes de mortalité des mammifères marins (Jauniaux, 2002 ; Lehnert *et al.*, 2010). Par exemple, les lésions inflammatoires résultant du parasitisme pulmonaire, ainsi que les infections bactériennes secondaires, constituent une cause fréquente de mortalité chez les odontocètes et les pinnipèdes (Lehnert *et al.*, 2010). De plus, il est important de savoir que l'exposition à des niveaux élevés de polluants tels que les organochlorés peut provoquer une altération de la réponse immunitaire et ainsi qu'une diminution de la résistance aux infections bactériennes (Dunn *et al.*, 2001). Parmi les agents bactériens que contractent les mammifères marins, certains sont transmissibles à l'homme (zoonose). C'est le cas par exemple de la leptospirose (*Leptospira interrogans*), la

tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*), l'érysipèle (*Erysipelothrix rhusiopathia*) ou encore la brucellose (*Brucella* spp.) (Higgins, 2000).

### 1.2.1. *Brucella* spp.

Les espèces du genre *Brucella* sont des bactéries coccobacilles intracellulaires facultatives à Gram-négatif de 0,7 µm de diamètre sur <1,5 µm de longueur, non mobiles (Foster *et al.*, 2007 ; Waltzek *et al.*, 2012 ; Elizalde-Bielsa *et al.*, 2023). Présente dans l'environnement marin et terrestre, *Brucella* spp. se développe entre 20 et 40°C, avec une température optimale autour de 34°C. Cette bactérie ne se reproduit pas en dehors d'un hôte, mais peut survivre pendant plusieurs années dans des tissus congelés (Nymo *et al.*, 2011 ; Cohen *et al.*, 2018).

Une des caractéristiques pathogéniques de *Brucella* spp. est qu'elle présente des PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) modifiés par rapport aux autres bactéries à GRAM-négatif. Cela permet de réduire la reconnaissance de la bactérie et donc de retarder l'activation de l'immunité innée de l'hôte contre cette dernière (Elizalde-Bielsa *et al.*, 2023). De plus, lors de son cycle intracellulaire, *Brucella* spp. est capable d'exprimer un système de sécrétion de type IVA (T4SS) de la famille VirB lui permettant *in fine* de proliférer dans la cellule-hôte (**Figure 3**) (de Figueiredo *et al.*, 2015 ; Celli, 2019).



**Figure 3 : Schéma représentant le cycle intracellulaire de *Brucella* spp. au sein d'une cellule-hôte phagocytaire.** L'expression du système T4SS par la bactérie permet de transloquer des protéines effectrices (points rouges) qui favorisent la formation de rBCV (replicative *Brucella* Containing Vacuole), une vacuole favorisant la prolifération bactérienne. eBCV = endosomal BCV, aBCV = autophagic BCV (Celli, 2019).

La brucellose est une maladie zoonotique provoquée par plusieurs espèces du genre *Brucella* qui affecte les mammifères terrestres, y compris l'homme, ainsi que les mammifères marins (Hernandez-Mora *et al.*, 2008). Ces espèces se divisent en 12 types, chacun ayant des hôtes préférentiels distincts. *B. abortus* (bovin), *B. melitensis* (mouton et chèvre), *B. suis* (porc), *B. ovis* (mouton), *B. canis* (chien) et *B. neotomae* (rat des bois) sont les six espèces « classiques » du genre *Brucella* qui, chacune d'entre elles, contiennent différents biovars. *B. ceti* et *B. pinnipedialis* sont les *Brucella* spp. marines infectant les mammifères marins. Enfin, *B. microti* (campagnol), *B. inopinata* (humain), *B. papiionis* (babouin) et *B. vulpis* (renard) sont les espèces les plus récemment décrites (Godfroid *et al.*, 2012 ; Guzman-Verri *et al.*, 2012 ; Kurmanov *et al.*, 2022 ; Elizalde-Bielsa *et al.*, 2023).

## 2. La brucellose dans l'environnement marin

Alors que les infections à *Brucella* spp. chez les mammifères terrestres sont connues depuis longtemps, ce n'est qu'en 1994 que la présence de cette bactérie chez les mammifères marins a officiellement été confirmée. Effectivement, une nouvelle souche de *Brucella* spp. a été détectée à partir de phoques communs, de marsouins et de dauphins communs en Ecosse. En Californie, un fœtus avorté d'un grand dauphin en captivité a également été signalé porteur de la bactérie (Foster *et al.*, 2007 ; Lambourn *et al.*, 2013). Depuis la découverte de ces nouvelles souches marines, il est établi qu'elles infectent une grande variété de mammifères marins, notamment les cétacés, les pinnipèdes et même la loutre d'Europe et la loutre de mer (Foster *et al.*, 1996 ; Spickler, 2018).

### 2.1. Distribution

La large tolérance aux températures de la bactérie lui permet de survivre dans diverses régions de l'océan mondial (Nymo *et al.*, 2011 ; Cohen *et al.*, 2018). Effectivement, les mammifères marins positifs à *Brucella* spp. sont retrouvés le long de la plupart des côtes continentales ainsi que dans de nombreuses mers et océans, incluant l'Arctique et l'Antarctique. Cependant, la majorité des individus infectés proviennent essentiellement de l'hémisphère Nord. Il est important de noter que cette observation pourrait être le résultat d'un niveau élevé d'échantillonnage dans cet hémisphère, plutôt que d'une répartition réelle de la bactérie (Spickler, 2018).

### 2.2. Les *Brucella* spp. marines

Actuellement, deux espèces de *Brucella* spp. marines sont connues pour infecter une grande variété de mammifères marins anciennement attribuées à l'espèce *Brucella maris*. Plus tard, les espèces *Brucella ceti* et *Brucella pinnipedialis* ont été distinguées, des isolats provenant de cétacés et de pinnipèdes, respectivement, même si des infections croisées peuvent parfois survenir (Cfr. 2.2.3. [Polyvalence infectieuse](#)) (Foster *et al.*, 2007 ; Godfroid *et al.*, 2012 ; Lambourn *et al.*, 2013). Alors que la souche *B. pinnipedialis* présente deux types de séquences distinctes (ST24 et ST25), *B. ceti* regroupe les souches ST23 (associés aux isolats de *B. ceti* des marsouins), ST26 (dauphins) et ST27 (grands dauphins) (Vargas-Castro *et al.*, 2023).

#### 2.2.1. [Infection chez les mammifères marins](#)

Les *Brucella* spp. marines ont déjà été récupérées à partir de plusieurs tissus et organes de cétacés et pinnipèdes tels que le sous-cutané, l'encéphale, le foie, la rate, les poumons, les

glandes et sécrétions mammaires, les ganglions lymphatiques, le sang, l'utérus et l'épididyme (Dagleish *et al.*, 2008 ; Nymo *et al.*, 2011). Contrairement aux mammifères terrestres où la rate est souvent utilisée comme organe de référence, chez les mammifères marins, c'est fréquemment le poumon qui constitue l'organe principal positif en fournissant un plus grand nombre de souches de *Brucella* spp. (Garner *et al.*, 1997 ; Foster *et al.*, 2002 ; Prenger-Berninghoff *et al.*, 2008). La présence de *B. ceti* a été décrite plusieurs fois dans le lait des cétacés (Gonzalez-Espinoza *et al.*, 2021 ; Vargas-Castro *et al.*, 2023).

L'infection par *Brucella* spp. chez les mammifères marins ne présente pas de prédilection sexuelle. Cependant, les individus sevrés, les jeunes d'un an et les subadultes sont les classes d'âge les plus exposées à la bactérie et donc les plus infectées. C'est effectivement après le sevrage des mammifères marins que la prévalence d'infection est la plus élevée, et tend à diminuer avec l'âge (Lambourn *et al.*, 2013 ; Rhyan *et al.*, 2018 ; Vargas-Castro *et al.*, 2023).

### 2.2.2. Lésions associées

Généralement, *B. ceti* et *B. pinnipedialis* sont isolées à partir d'individus asymptomatiques et provoquent rarement de grands changements pathologiques, mais certaines lésions sont principalement observées chez les cétacés (Nymo *et al.*, 2011 ; Thakur *et al.*, 2012 ; Cohen *et al.*, 2018 ; Spickler, 2018). Effectivement, l'infection à *B. ceti* peut tout de même être associée à différentes lésions aiguës et chroniques (Godfroid *et al.*, 2012 ; Colegrove *et al.*, 2018 ; Foster *et al.*, 2018 ; Vargas-Castro *et al.*, 2023). C'est le cas par exemple de méningo-encéphalite, de pneumonie, de lésions sous-cutanées, de nécrose et d'inflammation hépatique et splénique, d'inflammation des ganglions lymphatiques, de péritonite, de mammite, d'ostéomyélite, d'arthrite, de discospondylite, d'endocardite, d'épididymite ainsi que l'endométrite et la placentite pouvant parfois provoquer un avortement dans les pires cas (Foster *et al.*, 2018 ; Rhyan *et al.*, 2018 ; Orsini *et al.*, 2022). Lorsque les individus sont vivants, ces pathologies peuvent provoquer une désorientation, une incoordination des mouvements, des tremblements et des convulsions, conduisant parfois à une incapacité à maintenir la flottabilité (Hernandez-Mora *et al.*, 2008). Concernant *B. pinnipedialis*, les infections chez les phoques ne sont pas reconnues pour entraîner des pathologies graves car la plupart sont subcliniques. Ils présentent, cependant, généralement une pneumonie focale mais celle-ci serait plutôt majoritairement provoquée par la présence de nématodes pulmonaires, eux-mêmes infectés par la bactérie. De plus, un unique foyer de placentite suppurative et nécrosante, positif à *B. pinnipedialis*, a été signalé chez une otarie à fourrure du Nord, mais cette dernière a donné naissance à un nouveau-

né probablement vivant (Duncan *et al.*, 2014). Une arthrite granulomateuse chronique associée à *B. pinnipedialis* a également été relevée chez une loutre de mer (Spickler, 2018).

### 2.2.3. Polyvalence infectieuse

Malgré la préférence et l'incidence plus élevée de *B. ceti* chez les cétacés et de *B. pinnipedialis* chez les pinnipèdes, il se peut parfois que ces deux espèces bactériennes infectent respectivement les pinnipèdes et les cétacés. Plusieurs cas d'infection chez les cétacés, impliquant à la fois des odontocètes et des mysticètes, ont été associées à des souches *B. pinnipedialis*, comme le cas d'un béluga et d'un petit rorqual où la souche ST24 a été identifiée (Groussaud *et al.*, 2007 ; Whatmore *et al.*, 2017 ; Davison *et al.*, 2021). Récemment, *B. pinnipedialis* a été isolée pour la première fois à partir de deux grands dauphins, une mère et son jeune, marquant également la première fois où *Brucella* spp. a été isolée à partir du lait d'un cétacé femelle n'ayant pas avorté (Vargas-Castro *et al.*, 2023). Quelques cas ont également été signalés où *B. ceti* a été retrouvée chez des phoques du Groenland ainsi que des otaries de Californie (Groussaud *et al.*, 2007 ; Whatmore *et al.*, 2017).

## 2.3. Potentiel zoonotique

Les espèces marines de *Brucella* spp., tout comme leurs homologues terrestres, présentent également un potentiel zoonotique (Godfroid *et al.*, 2012 ; Orsini *et al.*, 2022). Jusqu'à présent, quatre cas d'infections humaines par *B. ceti* (ST27) ont été signalés. Parmi eux, un cas concernait un chercheur de laboratoire affirmant avoir été en contact avec cette bactérie, tandis que l'origine d'infection des trois autres cas est probablement liée à une consommation de fruits de mer crus (Whatmore *et al.*, 2008). Concernant *B. pinnipedialis*, aucun cas d'infection humaine n'a été signalé même si des isolats provenant de deux patients péruviens ont été identifiées comme étant étroitement liés à cette espèce (Sohn *et al.*, 2003).

La rareté des infections humaines par *B. ceti* et *B. pinnipedialis* soulève la question de savoir si cela est dû à de faibles niveaux d'exposition humaine aux bactéries ou à leur faible capacité à infecter les hôtes humains (Orsini *et al.*, 2022). Une autre explication très probable est une sous-estimation des cas de personnes infectées en raison du manque de diagnostic. Effectivement, plusieurs individus ayant été en contact avec des mammifères marins ont souffert de maladies chroniques, présentant des symptômes cliniques compatibles avec la brucellose pour lesquels aucun diagnostic n'a été établi (Van Bresseem *et al.*, 2009).

Toutefois, il est certain qu'avec l'augmentation des interactions entre les mammifères marins et les humains, le risque de transmission des *Brucella* spp. marines augmente également. Cette contamination peut survenir par contact direct ou indirect (Hernandez-Mora *et al.*, 2008 ; Gonzalez-Espinoza *et al.*, 2021).

#### 2.3.1. Contact direct

Les contacts directs, qu'ils se produisent dans les centres de réhabilitation ou dans d'autres environnements professionnels exposés, représentent un risque de transmission des *Brucella* spp. marines, d'autant plus que la bactérie a déjà été isolée à partir d'ulcères cutanées (Garner *et al.*, 1997 ; Jauniaux *et al.*, 2010). Ce risque est d'autant plus élevé lors de morsures, car des glandes salivaires et amygdales de certains individus se sont déjà également révélés positifs (Lambourn *et al.*, 2013 ; Gonzalez-Espinoza *et al.*, 2021). Il est également important de noter que les mammifères marins s'exposent aux *Brucella* spp. marines en ingérant leurs proies notamment (Cfr. 3.3. Transmission vectorielle). Par conséquent, les humains peuvent également être exposés à ces mêmes bactéries en consommant des poissons et/ou des invertébrés marins crus (Garner *et al.*, 1997 ; Lambourn *et al.*, 2013). De plus, la consommation de viandes de mammifères marins est assez courante dans au moins 114 pays, ce qui augmente d'avantage ce risque d'exposition (Hernandez-Mora *et al.*, 2013).

#### 2.3.2. Contact indirect

Concernant les contacts indirects, les zones côtières fréquentées par les phoques pour le repos et la reproduction représentent une importante source d'exposition pour les humains. Etant donné que la bactérie a déjà été isolée à partir de la vessie des pinnipèdes et de leurs excréments, il est suggéré que l'urine ou les matières fécales présentes sur les plages constituent une source potentielle de contamination pour l'homme (Lambourn *et al.*, 2013).

### **3. Transmission de *Brucella* spp. chez les mammifères marins**

Bien que la manière dont les *Brucella* spp. marines se transmettent chez les mammifères marins ne soit aujourd'hui pas encore parfaitement élucidée, il est prouvé qu'ils peuvent contracter la brucellose horizontalement, verticalement ainsi que via des parasites pulmonaires porteurs de la bactérie (Waltzek *et al.*, 2012 ; Spickler, 2018).

### 3.1. Transmission horizontale

Cette transmission concerne principalement les pinnipèdes qui, en raison de leur comportement social, se regroupent massivement sur des bancs de sable pratiquant le « hauling-out » pour se reproduire et/ou se reposer (Prenger-Berninghoff *et al.*, 2008 ; Godfroid *et al.*, 2012). Ce comportement facilite le transfert de la bactérie entre individus infectés, notamment par le contact avec des sécrétions de naissances infectées, les fèces ou encore l'urine. De plus, lors de conflits, les morsures amplifient le risque de transmission (Hernandez-Mora *et al.*, 2013 ; Cohen *et al.*, 2018).

### 3.2. Transmission verticale

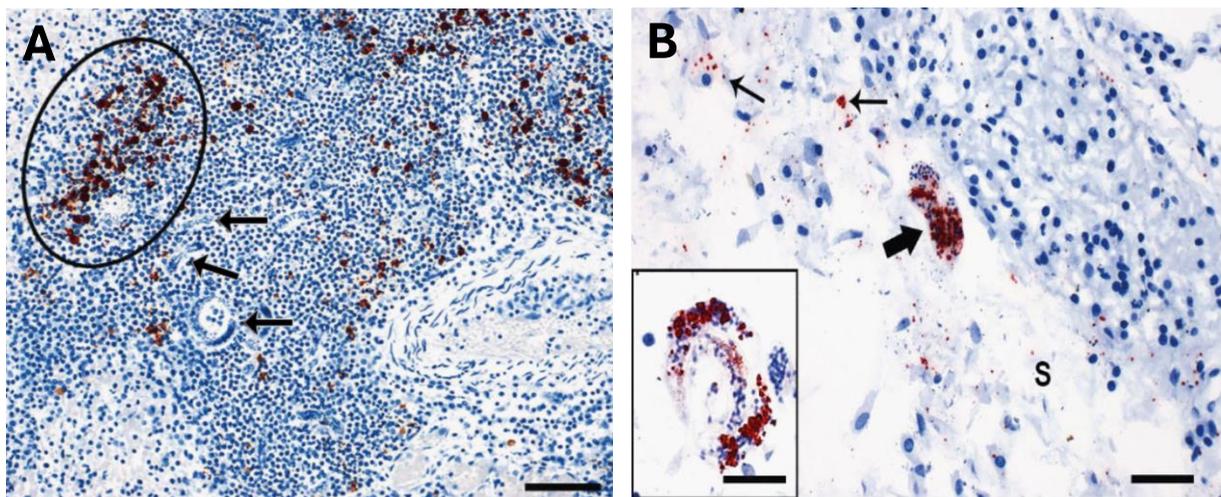
La transmission verticale consiste au transfert de la bactérie de la mère à son jeune, durant la gestation ainsi que la lactation (Cohen *et al.*, 2018). Cela a été suggéré chez les cétacés lorsque *B. ceti* a été isolé à partir de fluides de naissances, de tissus fœtaux ainsi que du lait et des glandes mammaires (Hernandez-Mora *et al.*, 2008 ; Jauniaux *et al.*, 2010). Cependant, aucune preuve d'une telle transmission n'a été établie chez les pinnipèdes (Foster *et al.*, 2018). Effectivement, la faible prévalence d'anticorps (Ac) anti-*Brucella* au niveau des nouveaux nés et l'absence de placentite chez les phoques ne parviennent pas à favoriser la transmission transplacentaire ou transmammaire (Lambourn *et al.*, 2013).

Néanmoins, il est possible que les phoques nouveaux-nés contiennent des Ac anti-*Brucella*. Cela pourrait s'expliquer par le transfert maternel d'Ac anti-*Brucella* au nouveau-né, principalement durant l'allaitement à travers le colostrum. Ainsi, le niveau d'Ac anti-*Brucella* chez les petits reflèterait celui des mères, résultant plutôt d'un transfert maternel d'Ac que d'une infection verticale (Foster *et al.*, 2018).

### 3.3. Transmission vectorielle

L'isolement de *Brucella* spp. à partir de vers pulmonaires d'un phoque commun en 1996 suggère que la transmission de cette bactérie chez les mammifères marins peut également s'effectuer par l'intermédiaire de nématodes pulmonaires infectés. Ces parasites, en utilisant le mammifère marin comme hôte définitif, agissent alors comme vecteurs dans la transmission de *Brucella* spp. chez ces animaux. Cela se produit lorsque le mammifère marin ingère des proies parasitées par les larves de ces nématodes porteuses de la bactérie, lesquelles finissent par se retrouver dans ses poumons. En effet, le cycle de vie des vers pulmonaires implique des poissons et/ou des invertébrés marins en tant qu'hôtes intermédiaires (Garner *et al.*, 1997 ;

Lambourn *et al.*, 2013 ; Colegrove *et al.*, 2018 ; Rhyan *et al.*, 2018 ; Gonzalez-Espinoza *et al.*, 2021). Cette voie de transmission permettrait d'expliquer pourquoi la plupart des mammifères marins *Brucella*-positifs présentent une bronchopneumonie vermineuse (Prenger-Berninghoff *et al.*, 2008 ; Lambourn *et al.*, 2013). Dans le poumon, la présence de *Brucella* spp. dans des granulomes contenant des larves, ainsi que la présence d'antigènes *Brucella* spp. dans les macrophages proches des nématodes infectés, suggère que l'exposition à des nématodes infectés est à l'origine de l'infection pulmonaire par cette bactérie (Figure 4) (Garner *et al.*, 1997).



**Figure 4 :** A et B) Coupe histologique d'un poumon d'un phoque commun mettant en évidence les larves *Parafilaroides* spp. et l'infection à *B. pinnipedialis*. **A)** Pneumonie focale dans laquelle les larves (flèches) sont à proximité des cellules inflammatoires infectées par la bactérie (relevées en rouge). Taille de la barre : 50  $\mu$ m. **B)** Larve de premier stade (L1) infectée (grosse flèche) au niveau d'un septum interlobulaire (S). Les bactéries (fines flèches) sont également visibles à proximité des larves. Taille de la barre : 25  $\mu$ m (Rhyan *et al.*, 2018).

La transmission vectorielle a d'autant plus été étayée lorsque *B. pinnipedialis* a été détecté chez les phoques barbus, présentant un comportement solitaire. Ce type de comportement suggère que la transmission entre individus est fortement restreinte et en plus de cela, la transmission verticale chez les phoques n'est pas encore évoquée. Cette situation renforce donc l'hypothèse selon laquelle l'infection par *Brucella* spp. est acquise à partir de l'environnement, potentiellement par le biais d'ingestion de poissons et/ou invertébrés eux-mêmes contaminés par des larves infectées (Foster *et al.*, 2018).

## 4. Parasitisme par les nématodes pulmonaires

Les nématodes pulmonaires, également appelés les métastrongles, parasitent le système respiratoire, cardiovasculaire et même parfois le système auditif des mammifères marins. Trois familles de vers pulmonaires parasitent les mammifères marins, partageant un cycle de vie similaire malgré leur diversité ; les Filaroididae (*Parafilaroides* spp.) et les Crenosomatidae (*Otostrongylus circumlitus*) qui parasitent les pinnipèdes, et les Pseudaliidae qui infestent les cétacés (Lehnert *et al.*, 2010 ; Fischbach et Seguel, 2023). Chez les espèces, tels que les mammifères marins, qui nécessitent une fonction respiratoire et auditive optimale pour leur condition physique, la virulence des vers pulmonaires pourrait être suggérée comme plus élevée (Fischbach et Seguel, 2023).

Il est important de noter que tous les nématodes *Brucella*-positifs sont observés chez des individus présentant un état brucellique positif. Cependant, il est possible que des mammifères marins soient positifs pour *Brucella* spp. sans pour autant être parasités au niveau des poumons. Cela démontre donc que la transmission vectorielle par les parasites constitue une voie de transmission supplémentaire des autres voies possibles (horizontale et verticale) (Fischbach et Seguel, 2023).

### 4.1. Voie d'entrée bactérienne secondaire

L'infestation des voies respiratoires et du parenchyme pulmonaire par les vers pulmonaires peut parfois occasionner des lésions tissulaires, provoquant ainsi une réponse inflammatoire qui facilite l'entrée et la colonisation de bactéries. De ce fait, la bronchopneumonie vermineuse est souvent compliquée par une infection bactérienne secondaire (Fischbach et Seguel, 2023).

### 4.2. Lésions associées

Les lésions liées à la présence de vers pulmonaires chez les mammifères marins sont variables, allant de simples signes de congestion du poumon jusqu'à des cas de bronchopneumonie, pouvant évoluer vers des formes sévères de suppuration obstructive ou même de nécrose (Measures, 2001). Effectivement, le niveau de pathogénie provoqué par les nématodes pulmonaires dépend de la charge parasitaire ainsi que de l'immunité de l'hôte (Measures, 2001 ; Fischbach et Seguel, 2023). La réponse immunitaire de l'hôte cible généralement les structures cuticulaires des parasites ainsi que leurs larves, entraînant l'attraction de macrophages, d'éosinophiles et de lymphocytes vers le site d'infection (Fischbach et Seguel, 2023). De plus,

une infection bactérienne secondaire peut générer une pneumonie suppurative diffuse ainsi que la formation d'abcès (Geerinckx *et al.*, 2021).

Les pneumonies provoquées par la charge parasitaire entraînent souvent une détresse respiratoire, affectant directement la capacité de plongée des mammifères marins. De plus, il semblerait que l'obstruction provoquée par les nématodes puissent également perturber la capacité à chercher de la nourriture et ainsi entraîner une diminution de la prise de poids (Lehnert *et al.*, 2010 ; Reckendorf *et al.*, 2021). Les lésions inflammatoires résultant du parasitisme pulmonaire, ainsi que les infections bactériennes secondaires, constituent une cause fréquente de mortalité chez les odontocètes et les pinnipèdes (Lehnert *et al.*, 2010).

### 4.3. Vers pulmonaires des pinnipèdes

#### 4.3.1. *Parafilaroides* spp.

Les méastrongles du genre *Parafilaroides* spp., appartenant à la famille Filaroididae, sont de petits nématodes généralement enroulés dans le parenchyme pulmonaire des phoques et des otaries. Ils résident généralement dans les alvéoles ainsi que les petites bronchioles des pinnipèdes. Ce genre comprend sept espèces parmi lesquelles *P. gymnurus*, *P. decorus*, *P. hispidus*, *P. measuresae* et *P. gullandae* sont typiquement associées aux pinnipèdes de l'hémisphère Nord, tandis que *P. hydrurgae* et *P. normani* sont originaires de l'hémisphère Sud. Ces espèces de méastrongles ont pour hôte principal les Phocidae, à l'exception de *P. decorus* et *P. normani*, qui sont spécifiques aux Otariidae (Measures, 2001 ; Dailey, 2006 ; Dailey, 2009). Seul *P. gymnurus* infectent les phoques communs de l'Atlantique occidentale (Elson-Riggins *et al.*, 2020). Les caractéristiques morphologiques des nématodes du genre *Parafilaroides* sont une cuticule lisse, une musculature polymarienne et coelomyarienne, un tractus digestif bordé de cellules multinucléées, de petits spicules et une absence de papilles caudales (Garner *et al.*, 1997 ; Elson-Riggins *et al.*, 2020).

#### 4.3.2. *Otostrongylus circumlitus*

Principalement limité à l'hémisphère Nord, *Otostrongylus circumlitus*, seule espèce de ce genre et de la famille Crenosomatidae, est un grand nématode couramment retrouvé dans les voies respiratoires des phoques et occasionnellement, dans l'éléphant de mer du nord. Adulte, il réside dans la trachée, bronches et bronchioles du pinnipède. Il peut également parfois se retrouver dans le ventricule droit et dans les artères pulmonaires (Measures, 2001 ; Leidenberger et Boström, 2009 ; Geerinckx *et al.*, 2021). Généralement, *O. circumlitus* s'oriente inversement par rapport à son hôte, c'est-à-dire avec la partie antérieure profondément incrustée dans le

parenchyme pulmonaire et la partie postérieure est libre vers les voies respiratoires supérieures. Ce parasite pulmonaire de grande taille affecte à la fois la santé et la capacité de plongée des phoques, entraînant des répercussions directes sur leur alimentation, leur croissance et leur survie (Measures, 2001).

*O. circumlitus* possède une cuticule transparente, bombée au niveau de l'extrémité antérieure ; le bulbe œsophagien. Alors que les femelles gravides contiennent généralement des œufs ainsi que des larves L1 à l'intérieur de l'utérus, les mâles adultes possèdent une bourse copulatrice entourées de rayons courts et rigides à l'extrémité postérieure (Leidenberger et Boström, 2009 ; Geerinckx *et al.*, 2021).

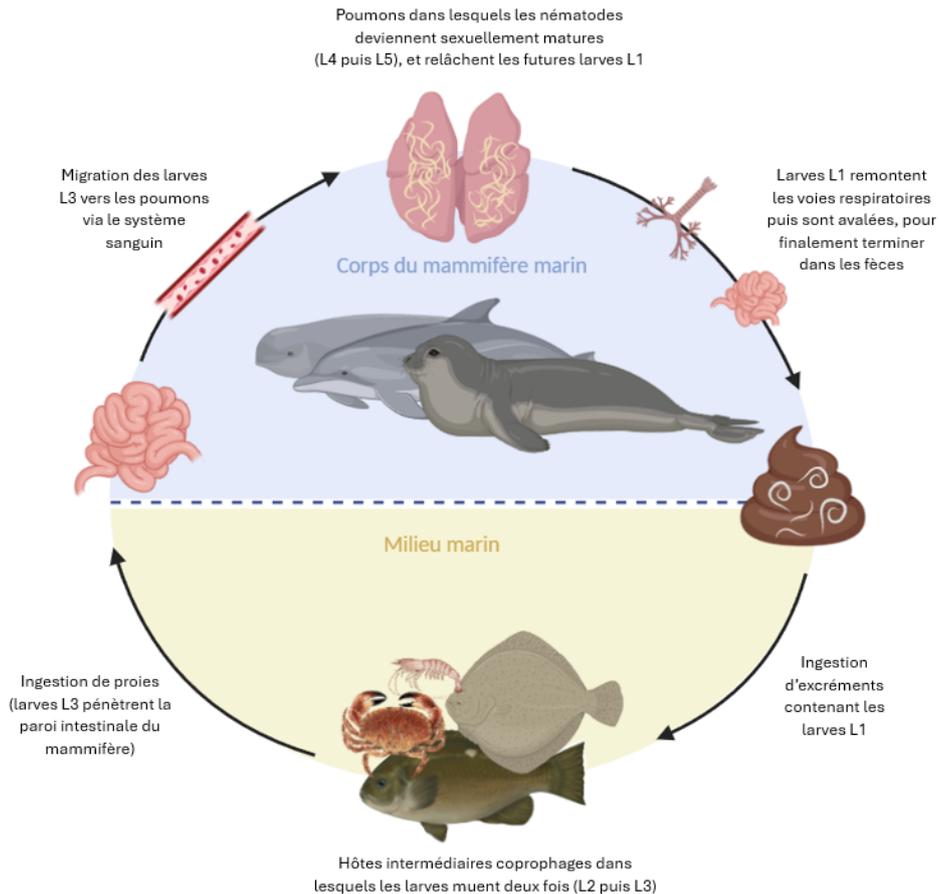
#### 4.4. Vers pulmonaires des cétacés

##### 4.4.1. Pseudaliidae

Les nématodes de la famille des Pseudaliidae se limitent principalement aux Odontocètes, infectant principalement leur tractus respiratoire ainsi que leurs sinus crâniens et auditifs (Measures, 2001 ; Reckendorf *et al.*, 2018). Cette famille comprend huit genres, mais seuls cinq d'entre eux sont connus pour infecter les voies respiratoires des cétacés à dents : *Pseudalius*, *Torynurus*, *Halocercus*, *Stenurus* et *Skrjabinalius*. En mer du Nord, les trois espèces de nématodes Pseudaliidae qui parasitent les poumons des cétacés sont *Pseudalius inflexus*, *Torynurus convolutus* et *Halocercus invaginatus*. Malgré leur ressemblance, *P. inflexus* et *T. convolutus* ont tendance à coloniser préférentiellement les bronches, les bronchioles et les vaisseaux sanguins de l'animal, alors que *H. invaginatus* se localise généralement dans le parenchyme pulmonaire, formant des nodules encapsulés (Measures, 2001 ; Reckendorf *et al.*, 2021 ; Pool *et al.*, 2023).

#### 4.5. Cycle de vie des vers pulmonaires chez les mammifères marins

Le cycle de vie du ver pulmonaire *P. decorus*, qui infecte l'otarie de Californie, a bien été décrit par Dailey en 1970. Il est donc suggéré que le cycle de vie des autres nématodes *Parafilaroides* spp. et de *O. circumlitus* chez les phoques ainsi que les Pseudaliidae chez les cétacés soit similaire à celui de *P. decorus*. (**Figure 5**) (Lehnert *et al.*, 2010 ; Reckendorf *et al.*, 2018 ; Rhyan *et al.*, 2018). Malgré leur spécificité évidente d'hôte définitif, ces nématodes utilisent les mêmes espèces de proies en tant qu'hôtes intermédiaires (Lehnert *et al.*, 2010).

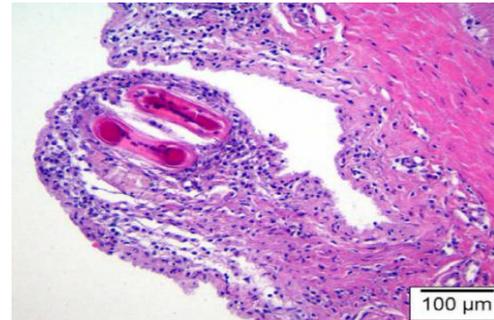


**Figure 5 : Cycle de vie des vers pulmonaires qui infectent les mammifères marins (réalisé par mes soins à l'aide de l'application BioRender).**

Les larves de premier stade larvaire (L1) sont relâchées par les nématodes femelles adultes résidant dans les poumons du mammifère marin, et peuvent alors être observées dans le mucus pulmonaire. Ces larves L1 remontent les voies respiratoires probablement par l'action du « tapis roulant » muco-ciliaire. Elles sont ensuite soit expectorées et ainsi rejetées dans le milieu marin chez les cétacés, soit avalées par les pinnipèdes, pénétrant ainsi dans le système digestif pour être finalement éliminées par les excréments dans l'environnement. Ces fèces sont ensuite consommées par des poissons coprophages tels que la calicagère verte (*Girella nigricans*), proie de l'otarie de Californie. La plie (*Pleuronectes platessa*), la limande commune (*Limanda limanda*), la limande-sole (*Microstomus kitt*) sont également coprophages et constituent une partie du régime alimentaire des phoques et des marsouins en mer du Nord (Lehnert *et al.*, 2010 ; Rhyan *et al.*, 2018). La souris de mer (*Agonus cataphractus*) en mer du Nord, consommée par les phoques, ingère également des fèces infectées (Rhyan *et al.*, 2018). Des invertébrés marins coprophages, tels que les crevettes *Pandalus* spp et les crabes du genre *Cancer* spp. peuvent aussi intervenir en tant qu'hôtes intermédiaires (Lambourn *et al.*, 2013).

Il est important de noter que c'est après le sevrage des mammifères marins que la prévalence d'infection à *Brucella* spp. est la plus élevée, lorsque leur alimentation se compose principalement de poissons et d'invertébrés marins. Cela renforce l'hypothèse selon laquelle ces proies sont probablement responsables de la transmission de cette bactérie chez les mammifères marins (Lambourn *et al.*, 2013).

Les larves, une fois ingérées par le poisson ou l'invertébré marin, s'enkystent dans la paroi intestinale et les tissus adjacents tels que la graisse mésentérique ou encore le pancréas de cet hôte, subissant par la suite deux mues (L2 puis L3) successives (**Figure 6**) (Lehnert *et al.*, 2010 ; Rhyan *et al.*, 2018). Les larves du troisième stade (L3) encapsulées sont ensuite transmises au mammifère marin lorsque ce dernier consomme sa proie, en l'occurrence le poisson ou l'invertébré. Les larves L3 relâchées, se retrouvent enfin dans le système digestif du mammifère et traversent la paroi intestinale pour finalement se retrouver dans les poumons de l'animal via le système cardio-vasculaire (Measures, 2001 ; Rhyan *et al.*, 2018 ; Geerinckx *et al.*, 2021 ; Fischbach et Seguel, 2023). C'est dans les poumons que les larves entreprennent leur quatrième et dernière mue (L4 puis L5) et deviennent donc sexuellement matures. Une fois devenus adultes (L5), les nématodes se reproduisent et les futures larves L1 seront à nouveau relâchées par les nématodes femelles (Rhyan *et al.*, 2018).



**Figure 6 : Coupe histologique de la muqueuse intestinale d'une limande commune (*Limanda limanda*). Une larve de nématode pulmonaire est observée (Lehnert *et al.*, 2010).**

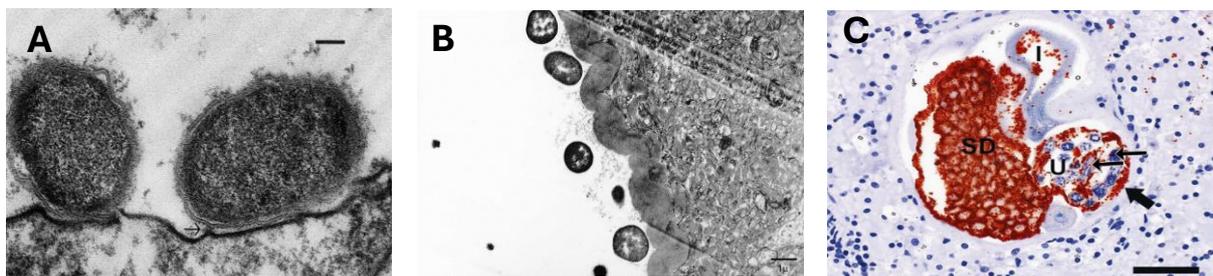
Lorsque les nématodes se trouvent dans les voies respiratoires ou dans le système cardio-vasculaire du mammifère marin, ils se nourrissent des cellules épithéliales et/ou endothéliales, des débris cellulaires ou encore du sang de l'hôte (Fischbach et Seguel, 2023). De plus, il est important de souligner que les larves L1, migrant à l'intérieur de l'individu, sont les plus pathogènes, étant responsables des plus grandes réponses inflammatoires (Garner *et al.*, 1997). Cela pourrait s'expliquer par le fait que certains stades larvaires possèdent une projection pointue au bout de leur queue qui peut probablement causer des lésions, surtout par ces larves qui ne migrent pas rapidement (Howard *et al.*, 1998).

#### 4.6. Portance de *Brucella* spp. par les vers pulmonaires

En 1996, une découverte marquante a été faite lorsque *Brucella* spp. a été détecté dans l'intestin et l'utérus de nématodes pulmonaires *Parafilaroides* spp. prélevés sur un phoque commun, suivi de découvertes similaires chez d'autres phoques peu après (Garner *et al.*, 1997 ; Maratea *et al.*, 2003). Par la suite, des chercheurs ont également prouvé que les nématodes pulmonaires de marsouins communs pouvaient aussi être infectés par la bactérie (Perrett *et al.*, 2004 ; Dawson *et al.*, 2008 ; Maio *et al.*, 2014).

##### 4.6.1. Relation entre le cycle de vie des vers pulmonaires et *Brucella* spp.

Une étude ultérieure a montré que les larves L1 et L4 des vers *Parafilaroides* spp. étaient infectées par *Brucella* spp (Rhyan *et al.*, 2018). En plus d'être présente au niveau des poumons et des intestins des mammifères marins, la bactérie réside principalement dans la lumière intestinale des larves et des nématodes adultes. Elle est également présente dans les organes reproductifs des adultes, qu'ils soient mâles ou femelles, ce qui suggère une transmission vénérienne entre les nématodes (Figure 7). Effectivement, le sperme infecté des adultes mâles est transmis aux femelles, chez lesquelles des larves infectées se développent dans l'utérus (Figure 7). Ces larves peuvent soit mourir puis dégénérer *in utero*, soit être relâchées dans le milieu pulmonaire et ainsi poursuivre leur cycle de vie et également, permettre la transmission de l'infection (Rhyan *et al.*, 2018).



**Figure 7 : A et B) Microscopie électronique (ME) de bactéries coccobacilles *Brucella* spp. qui adhèrent à l'épithélium de l'utérus de nématodes pulmonaires femelles adultes. A) ME de *Parafilaroides* spp. dans le poumon d'un phoque commun. La flèche montre l'adhérence de la membrane externe de la bactérie à la membrane plasmique de la cellule épithéliale utérine. Taille de la barre = 0,2941  $\mu\text{m}$  (Garner *et al.*, 1997). B) ME de *P. inflexus* dans le poumon d'un marsouin commun. Taille de la barre = 1  $\mu\text{m}$  (Dawson *et al.*, 2008). C) Coupe histologique d'une section de *Parafilaroides* spp. adulte femelle (grosse flèche) dans les poumons d'un phoque commun. Par immunohistochimie, les bactéries *B. pinnipedialis* sont relevées en rouge. La bactérie est présente dans l'intestin (I), à l'intérieur et à l'extérieur des larves (fines flèches) en développement dans l'utérus (U), et forme de grandes colonies au niveau du dépôt de sperme (SD). Taille de la barre = 50  $\mu\text{m}$  (Rhyan *et al.*, 2018).**

Présente dans les larves, *Brucella* spp. peut alors remonter les voies respiratoires pour être expectorée chez les cétacés, et avalée chez les pinnipèdes, infectant ainsi les fèces de l'animal. Les poissons et/ou invertébrés marins coprophages seront alors également infectés à leur tour,

en raison de l'ingestion des larves porteuses de la bactérie. Lorsque ces proies, hôtes intermédiaires des nématodes, sont ingérées, les larves infectées pénètrent la paroi intestinale du mammifère pour finalement migrer jusqu'à ses poumons, tout en disséminant *Brucella* spp. au cours de leur migration. Cela pourrait permettre d'expliquer pourquoi certains tissus non-pulmonaires se révèlent parfois positifs à la bactérie (Rhyan *et al.*, 2018).

Dans les poumons, les nématodes adultes infectés peuvent répandre *Brucella* spp. de diverses manières : lors de la libération des larves L1, dans leurs excréments ou encore à leur mort lors de la dégénérescence. Toutefois, il est important de noter qu'une amplification de l'infection par *Brucella* spp. se produit lors de la reproduction sexuelle des adultes. A ce moment-là, les bactéries issues du sperme infecté peuvent se multiplier dans l'utérus de la femelle au niveau des larves L1, qui seront ultérieurement libérées. *Brucella* spp. peut effectivement pénétrer les larves lorsqu'elles sont dans l'utérus ou après la naissance, par leur cavité buccale (Rhyan *et al.*, 2018).

#### 4.6.2. Renversement de perspective

Rhyan et son équipe avancent l'idée selon laquelle les vers *Parafilaroides* spp. pourraient être l'hôte préféré de *B. pinnipedialis*, plutôt que le phoque lui-même. Selon cette hypothèse, le phoque pourrait être impliquée dans l'infection par *B. pinnipedialis* en fournissant un milieu de température adéquate à la concentration de vers pulmonaires infectés et non-infectés. Cette théorie est renforcée par la comparaison des poumons du mammifère marin à un lieu où les bovins se rassemblent pour se nourrir, favorisant ainsi la transmission de *B. abortus*. Dans ce contexte, le rôle des nématodes pulmonaires dans la transmission de *Brucella* spp. chez les mammifères marins n'est pas celui d'un vecteur, mais plutôt celui d'un hôte (Rhyan *et al.*, 2018).

## 5. Travaux précédemment réalisés

Plusieurs Travaux de Fin d'Etudes (TFE) ont déjà été réalisés sur la brucellose chez les mammifères marins échoués en côtes belge et française, sous la supervision de Thierry Jauniaux (Balin, 2016 ; Jouffroy, 2020 ; Polaert, 2021 ; De Trez 2023, Zouzou, 2023).

Depuis 1995, une hausse des échouages des mammifères marins le long des côtes françaises et belge a été observée (Polaert, 2021 ; Zouzou, 2023). Cette augmentation concerne particulièrement les marsouins, qui représente 93% des échouages de mammifères marins dans le Nord de la France (Polaert, 2021). Les principales causes de mortalité chez les cétacés et les phoques étudiés lors de ces études sont les captures accidentelles (40,5% pour les cétacés et 66% pour les phoques) suivies des maladies infectieuses (40% pour les cétacés et 31% pour les phoques), et enfin de l'émaciation (9,7% pour les cétacés et 12% pour les phoques) (Polaert, 2021 ; Zouzou, 2023). Parmi ces mammifères marins échoués, l'incidence de *Brucella* spp. semble être en augmentation par rapport aux données de Balin en 2016 (Jouffroy, 2020). De 2015 à 2020, 12,5% des cétacés échoués dans le Nord de la France ont été testés positifs à la bactérie (Polaert, 2021). Entre 2016 à 2023, seuls trois phoques échoués sur 37 ont été testés positifs (Zouzou, 2023). Balin souligne que les poumons des mammifères marins sont fréquemment infectés par *Brucella* spp. comme évoqué par plusieurs auteurs (Garner *et al.*, 1997 ; Foster *et al.*, 2002 ; Prenger-Berninghoff *et al.*, 2008), ce qui suggère une transmission potentielle de la bactérie par des nématodes pulmonaires.

Dès lors, Polaert (2021) a révélé par immunohistochimie des larves de nématodes pulmonaires fortement suspectes de porter la bactérie, chez un marsouin et un phoque commun. De Trez (2023) a confirmé par PCR que les larves de nématodes pulmonaires d'un marsouin commun étaient positives. Ces résultats soulignent l'importance de considérer ces parasites dans la transmission de la brucellose chez les mammifères marins.

## 6. Objectifs du travail

Le but de cette étude est alors de confirmer la transmission vectorielle de *Brucella* spp. par l'intermédiaire de larves parasitaires pulmonaires chez les mammifères marins. Depuis la mise en évidence que des vers pulmonaires *Parafilaroides* spp. prélevés sur un phoque commun étaient infectés par *Brucella* spp., la prise en compte du cycle de vie des nématodes est devenue essentielle dans la compréhension de la transmission de cette bactérie chez les mammifères marins (Garner *et al.*, 1997). Il est donc intéressant de savoir si les nématodes peuvent transmettre l'infection à travers leurs stades larvaires à l'hôte définitif, c'est-à-dire le mammifère marin (Rhyan *et al.*, 2018).

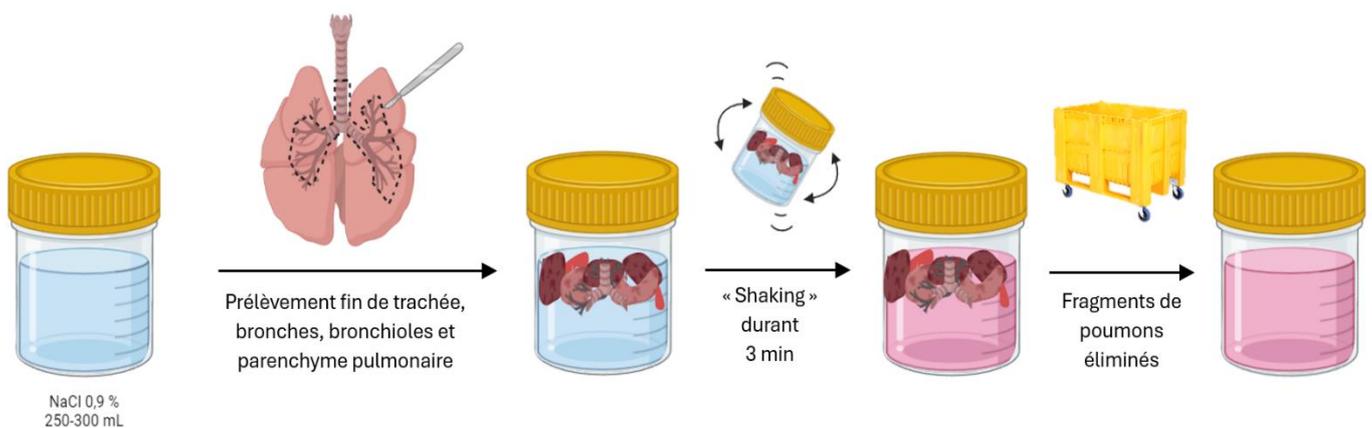
Les données de ce travail, s'étant déroulé de février à fin mai 2024, proviennent des autopsies de mammifères marins réalisées durant cette période ainsi que d'anciens échantillons conservés dans les congélateurs du service de morphologie et pathologie à l'Université de Liège. L'étude consiste donc à vérifier si les larves de stade L1, libérées par les nématodes femelles infestant le poumon de l'individu, sont infectées par *Brucella* spp. Ainsi, cela permettrait de confirmer la portance de la bactérie par les larves parasitaires pulmonaires, ce qui renforcerait l'hypothèse de transmission déjà évoquées par d'autres auteurs tels que Garner *et al.* en 1997 et Rhyan *et al.* en 2018 chez les phoques communs et Perrett *et al.*, en 2004 chez les marsouins communs.

## 1. Protocole

Dans le cadre de cette étude, la collecte de données est organisée en quatre étapes principales successives : 1) la récolte et le lavage des fragments de poumons en salle d'autopsie, 2) la concentration des larves L1 de nématodes 3) leur isolement laborieux par pipetage, et enfin, 4) l'extraction de l'ADN suivi de la PCR. Les méthodologies de ces quatre grandes étapes sont détaillées dans les sections suivantes.

### 1) Récolte et lavage des fragments de poumons

En salle d'autopsie, lorsqu'un individu contient des nématodes adultes dans ses voies respiratoires, les poumons sont isolés pour procéder à une série de manipulations (**Figure 8**). A l'aide d'un scalpel, la partie terminale de la trachée, les bronches et bronchioles sont prélevées ainsi que des fragments du parenchyme pulmonaire. Ces fragments incisés sont ensuite immergés dans un récipient rempli d'eau salée préalablement préparé ; environ 300 mL de solution de NaCl à 0,9%. L'étape suivante, appelée « shaking », consiste à agiter délicatement le pot de haut en bas durant trois minutes. Cette action favorise la pénétration de l'eau salée dans les bronches, bronchioles et alvéoles, contribuant ainsi à laver les fragments pulmonaires et à maximiser la récupération éventuelle de larves présentes dans ces multiples « canaux respiratoires ». Il est donc important d'avoir découpé le parenchyme en plusieurs morceaux afin d'augmenter la surface de contact avec l'eau de mer. Une fois le shaking terminé, les morceaux pulmonaires sont éliminés dans un bac réservé aux déchets d'équarrissage (**Figure 8**).



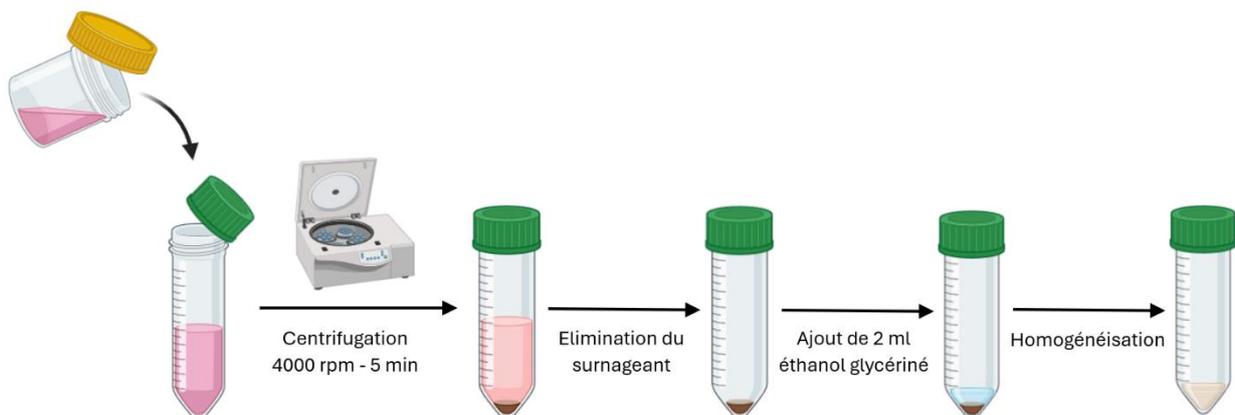
**Figure 8 : Schématisation des manipulations à procéder en salle d'autopsie, dans le but d'obtenir une solution contenant les larves de nématodes pulmonaires (réalisé par mes soins à l'aide de l'application BioRender).**

L'étape suivante ne se déroule que si, en parallèle, le pool d'échantillons (poumon, rate, encéphale, ganglions présaculaire et bronchique) prélevés sur l'individu en question s'est révélé positif à *Brucella* spp. par qPCR. Dans ce cas, l'état brucellique du mammifère est considéré comme positif, ce qui rend alors cet individu intéressant pour la suite des manipulations.

## 2) Concentration des larves

La concentration des larves L1 se déroule en deux sous-étapes, sous une hotte à flux laminaire en laboratoire.

La première consiste à concentrer la solution obtenue en salle d'autopsie par centrifugation. Pour ce faire, la solution est transférée dans un Falcon de 50 mL, puis centrifugée durant cinq minutes à 4000 rotations par minutes (rpm). Une fois le surnageant éliminé, le culot est homogénéisé à l'aide d'une micropipette après l'ajout de 2 mL d'éthanol glycéринé (éthanol 70%, glycérine 5%) (**Figure 9**). Cette centrifugation permet de concentrer les larves ainsi que tous les débris cellulaires et les éléments figurés du sang.



**Figure 9** : Schématisation des manipulations à procéder sous hotte laminaire, dans le but de concentrer grossièrement les larves (réalisé par mes soins à l'aide de l'application BioRender).

La seconde étape implique deux filtrations successives de la solution homogénéisée obtenue après centrifugation, visant à éliminer tous les éventuels macros-débris (**Figure 10**). Tout d'abord, la solution homogénéisée, contenant les larves dont celles du stade L1, est filtrée à travers un filtre cellulaire de 70 µm. Pour ce faire, la solution est injectée dans le filtre cellulaire à l'aide d'une micropipette, sous lequel est placée une boîte de Petri. Sous microscope ou loupe binoculaire, la solution qui a traversé le filtre, appelé filtrat, est minutieusement inspectée pour détecter la présence de larves parmi les débris cellulaires pulmonaires. En cas de présence de larves, les manipulations peuvent se poursuivre. Le filtrat est récupéré à l'aide d'une

micropipette dans un Falcon de 25 mL. Il est essentiel de « rincer » la boîte de Petri avec de l'éthanol glycéринé et d'aspirer celui-ci afin de minimiser la perte de larves car elles pourraient en effet rester accrochées à la surface de la boîte. Ensuite, le filtrat récupéré est centrifugé durant cinq minutes à 4000 rpm. Après élimination du surnageant, le culot est homogénéisé avec 2 mL d'éthanol glycéринé. A partir de là, une deuxième filtration est effectuée à l'aide d'un filtre cellulaire de 100 µm. Les étapes suivantes sont similaires à celles de la première filtration (Figure 10).

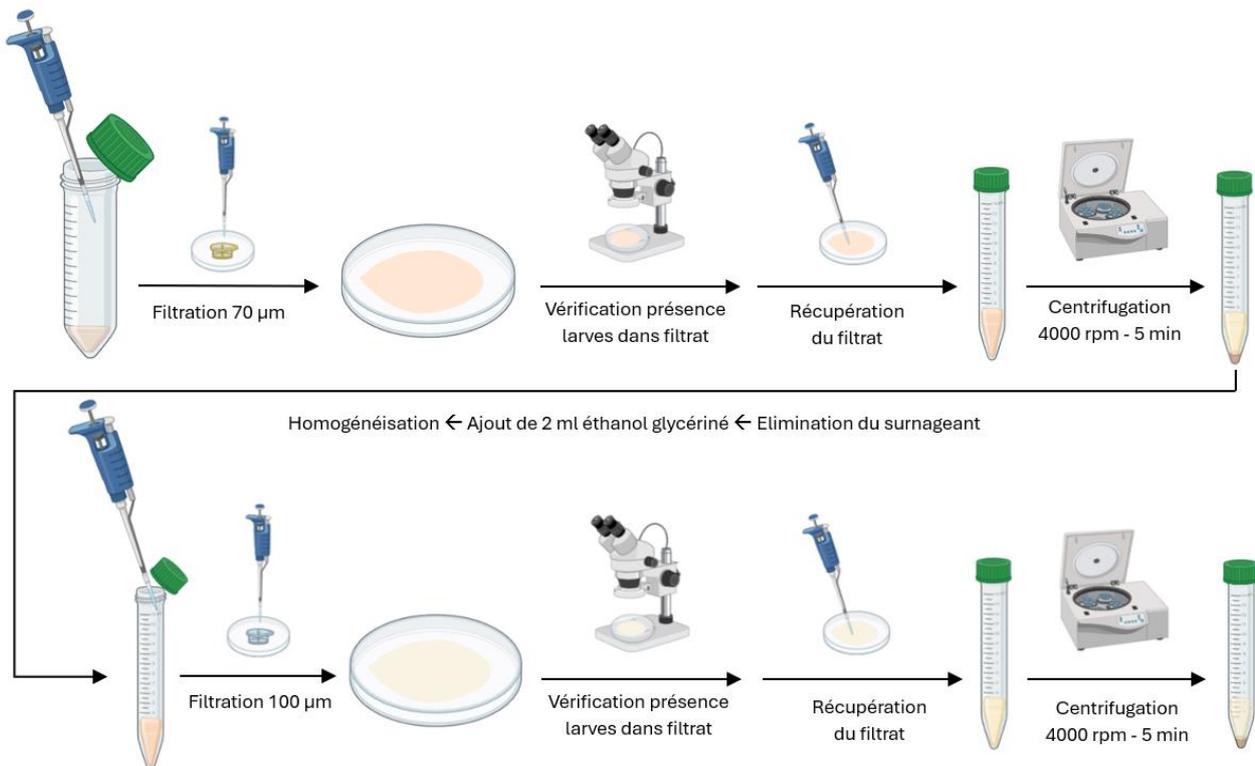
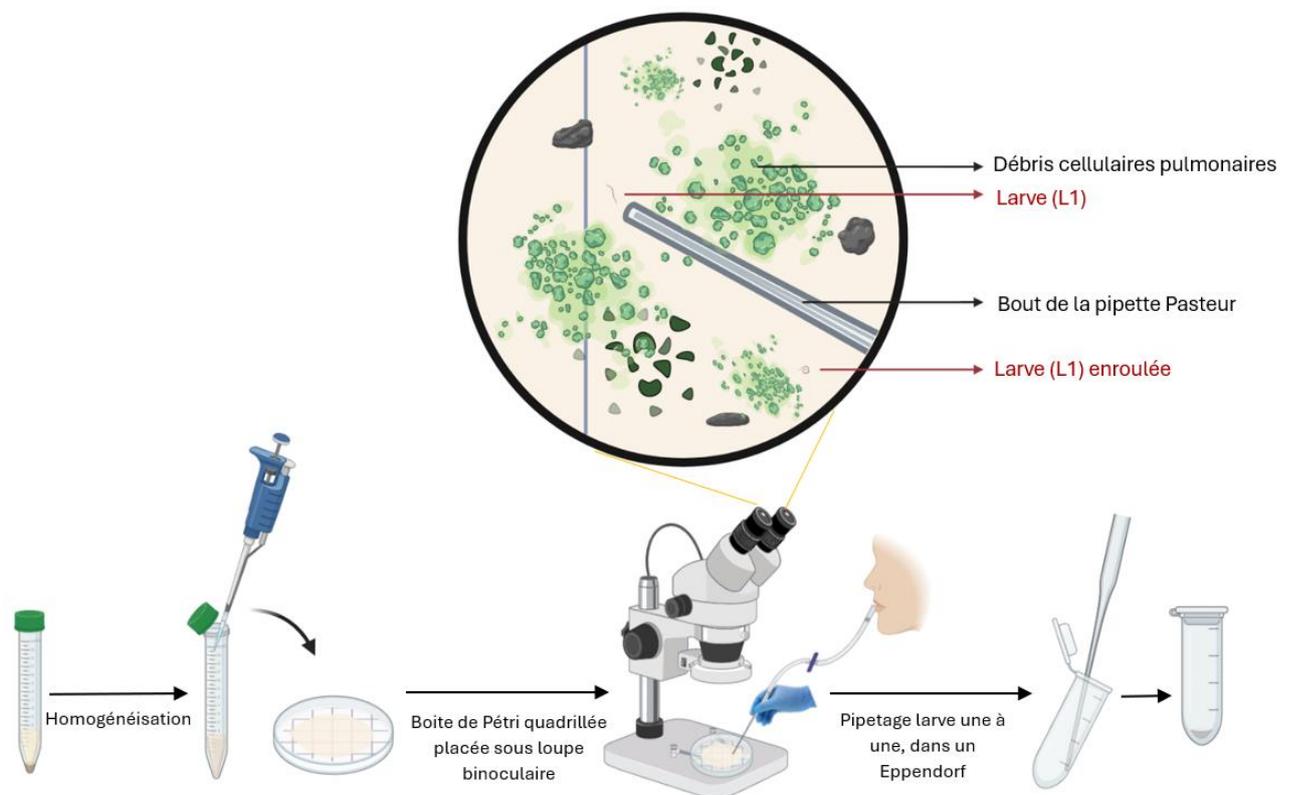


Figure 10 : Schématisation des manipulations à procéder sous hotte à flux laminaire, dans le but d'obtenir un filtrat de larves L1 ayant traversé deux filtres cellulaires successifs (réalisé par mes soins à l'aide de l'application BioRender).

### 3) Isolement des larves par pipetage

A partir du Falcon contenant le dernier filtrat de l'étape précédente, une partie est prélevée à l'aide d'une micropipette et déposée dans une boîte de Petri quadrillée (Figure 11). Sous loupe binoculaire et à l'aide d'une pipette Pasteur préalablement effilée par flamme et emboîtée dans un dispositif spécifique fabriqué par le département, les larves sont aspirées une par une et transférées dans un tube Eppendorf (Figure 11). Lors de cette opération, il est important de minimiser au maximum l'aspiration de débris cellulaires environnant. Idéalement, une vingtaine à une trentaine de larves sont pipetées.



**Figure 11 : Schématisation des manipulations à procéder sous loupe binoculaire, dans le but de pipeter les larves, une à une, contenues dans le filtrat (réalisé par mes soins à l'aide de l'application BioRender). Un champ de vision a été grossièrement représenté, mettant en évidence la difficulté de pipeter les larves microscopiques parmi les débris cellulaires.**

#### 4) Extraction ADN et PCR

Le but étant de savoir si les larves L1 sont porteuses de *Brucella* spp., il est nécessaire d'isoler et de purifier tout l'acide désoxyribonucléique (ADN) présent dans ces larves, et ensuite de procéder à la détection de l'éventuelle présence d'ADN de la bactérie par qPCR.

##### Préparation à l'extraction de l'ADN

A partir de l'Eppendorf contenant les trentaines de larves, 600  $\mu$ L de tampon de lyse (provenant de la plaque n°1 du TANBead Nucleic Acid Extraction Kit) est ajouté. Ensuite, une bille en acier inoxydable de 5 mm de diamètre est insérée dans l'Eppendorf, qui est ensuite placé dans la machine Qiagen Retsch TissueLyser II. La machine est réglée à une fréquence de 30 hertz durant trois minutes. Cette agitation à grande vitesse permet de broyer tout tissu organique, de sorte à obtenir un lysat cellulaire. Après cela, une centrifugation de trois minutes à 13000 ref (relative centrifugal force) est effectuée, permettant de séparer les macros-débris tissulaires du surnageant, où se trouve l'ADN non purifié des larves. Enfin, tout le surnageant est prélevé par pipetage (environ 600  $\mu$ L).

## Extraction de l'ADN

Cette étape implique l'utilisation de la machine d'extraction TANBead Maelstrom 9600 ainsi que son kit d'extraction (TANBead Nucleic Acid Extraction Kit). Ce dernier comprend six plaques, chacune dotée de puits dans lesquels différents tampons permettent de réaliser l'extraction et la purification de l'ADN du lysat cellulaire. Ces plaques sont désignées comme suit :

La plaque n°1 contient le Lysis Buffer, la plaque n°2 contient le Washing Buffer 1. La plaque n°3 est remplie du Washing Buffer 2 (1). Dans la plaque n°4 se trouve le Washing Buffer 2 (2). La plaque n°5, nommée Magnetic Beads, renferment des billes magnétiques capables d'attirer l'ADN grâce à leurs charges négatives. Enfin, la plaque n°6 contient l'Elution Buffer.

Avant de positionner correctement les six plaques dans la machine d'extraction, il est primordial d'ajouter 10 µL de protéinase-K dans le puits de la plaque n°1 (**Figure 12**). Cette enzyme digère les protéines du lysat, ce qui permet une extraction plus efficace de l'ADN. Ensuite, le surnageant (le lysat cellulaire) prélevé lors de l'étape précédente est également introduit dans ce même puits. Une fois cela fait, les six plaques sont méticuleusement disposées dans la machine d'extraction avant de lancer le processus, qui prend environ 45 minutes. A la fin du traitement par la machine, les 50 µL de solution présente dans le puits de la plaque n°6 (Elution Buffer), sont prélevés à l'aide d'une micropipette et transférés dans un nouvel Eppendorf. Dans cet Eppendorf se trouve donc l'ADN purifié provenant des centaines de larves (**Figure 11**).



Figure 12 : Les grandes étapes à réaliser afin d'extraire et de purifier l'ADN d'un échantillon en question, dans ce cas-ci, des larves (MayflowerBioscience.com).

## Préparation à la qPCR

La qPCR, abréviation de PCR quantitative, est une méthode spécifique de la réaction en chaîne par polymérase (PCR). Son principe fondamental est d'amplifier sélectivement l'ADN cible tout en surveillant en temps réel le processus d'amplification. Cela permet d'obtenir des mesures précises de l'abondance du matériel génétique recherché, en l'occurrence celui de la bactérie *Brucella* spp.

La préparation du mélange de réaction est réalisée dans une microplaque. Tout d’abord, cette opération s’effectue sous une hotte à flux laminaire dédiée aux préparations de PCR, excluant l’ADN. Ensuite, le processus se poursuit sous une hotte à flux laminaire spécifiquement réservée à l’ajout d’ADN, qui est effectué en dernier lieu. Dans chaque puits de la microplaque, les composants requis sont ajoutés comme détaillé dans le **Tableau 1**.

**Tableau 1** : Quantité des composants du mélange réactionnel de chaque puits de la microplaque pour la qPCR.

|                                      |        |
|--------------------------------------|--------|
| Master Mix ADN (LUNA qPCR Probe)     | 7,5 µL |
| H <sub>2</sub> O                     | 4 µL   |
| Mix amorces <i>Brucella</i> (R et F) | 1,5 µL |
| ADN                                  | 2 µL   |
| Volume total du puits                | 15 µL  |

 : Sous hotte à flux laminaire dédiée aux préparations de PCR (sans ADN)

 : Sous hotte à flux laminaire dédiée aux manipulations avec ADN

### qPCR

La qPCR s’effectue grâce à l’appareil Real Time PCR Cycler associé au logiciel StepOnePlus Real-Time PCR System.

Chaque qPCR est caractérisée par un cycle seuil (Ct), correspondant au nombre de cycles d’amplification à partir duquel la quantité d’ADN de la bactérie est détectable, permettant ainsi d’évaluer sa quantité initiale présente dans l’échantillon. Au plus sa valeur est faible, au plus la quantité d’ADN *Brucella* est élevée, et inversement.

## 2. Individus étudiés

Durant la période de ce stage, 13 phoques et 8 cétacés ont été nécropsiés au total ; 6 phoques gris, 7 phoques communs, 4 marsouins communs ainsi que 3 dauphins communs et 1 petit rorqual (**Annexe 1**). Parmi ceux-ci, les individus pertinents pour cette étude étaient donc ceux dont l’état brucellique est positif (= dont le pool d’organes s’est révélé positif) et qui présentent une infestation parasitaire des voies respiratoires. Ainsi, deux phoques ont été inclus dans l’étude, et le protocole décrit dans la section précédente a donc été appliqué à chacun de leurs poumons (**Tableau 2**). Les pools d’organes ont ensuite chacun été « dépoolé » afin de déterminer quels organes sont réellement positifs (**Tableau 2**).

**Tableau 2.** Caractéristiques générales des individus autopsiés, dont les poumons ont été prélevés pour l'étude, c'est-à-dire ceux dont l'état brucellique était positif et qui étaient parasités au niveau des poumons. (P = poumon ; GglPré = ganglion pré-scapulaire ; GglB = ganglion bronchique ; R = rate ; GIM = glande mammaire ; E = encéphale).

|  |  <br>A24/5014 | <br>A24/5021                               |
|--|---|---|
| Espèce   | <i>P. vitulina</i>  | <i>P. vitulina</i>  |
| Code conservation                                | 2   | 2   |
| Sexe et âge                                      | Femelle juvénile  | Mâle juvénile   |
| Etat nutritionnel                                | Emaciation intermédiaire  | Emaciation sévère   |
| Cause de la mort                                 | Origine infectieuse<br>(Pneumonie aigüe séro-hémorragique)  | Origine infectieuse   |
| Infestation parasitaire du système pulmonaire    | <b>Légère</b><br>( <i>Parafilaroides</i> spp.)  | <b>Sévère</b><br>( <i>O. circumlitus</i> )  |
| Etat brucellique (Organes positifs « dépoolés ») | <br><b>Positif</b><br>(P/GglPré/GglB/R/E)  | <br><b>Positif</b><br>(P/GglBPré/GglB/R) |

Pour augmenter le nombre d'individus pertinents, en plus de ceux autopsiés durant la période du stage, des échantillons de poumons congelés provenant d'espèces anciennes ont également été étudiés. Ces échantillons devaient impérativement provenir d'individus parasités au niveau des poumons et dont l'état brucellique avait été révélé positif. Pour ce faire, un tableau récapitulatif de tous les individus *Brucella*-positifs autopsiés, de 2005 à aujourd'hui, a été établi (**Annexe 2**). Parmi ceux-ci, certains présentaient une infestation des voies respiratoires (**Cfr \* Annexe 2**). Ce sont donc ceux-là qui étaient d'intérêt pour l'étude. Cependant, seuls les échantillons de poumons congelés provenant de cinq individus ont été accessibles (**Tableau 3**). Pour ces échantillons, la première étape du protocole (récolte et lavage des fragments de poumons) n'a donc pas été réalisée en salle d'autopsie, étant donné que le shaking a été effectué sur des échantillons de poumons déjà fragmentés disponibles dans le congélateur, le poumon entier n'étant plus disponible.

Les données de l'état brucellique (pool d'organes et/ou organes « dépoolés » positifs) de chaque individu ont été récupérées des résultats des anciens travaux (**Tableau 3**) (Balin, 2016 ; Polaert, 2021 ; Zouzou, 2023).

**Tableau 3.** Caractéristiques générales des individus (parasités au niveau pulmonaire et dont l'état brucellique est positif), dont les échantillons de poumons étaient congelés. (P = poumon ; GglPré = ganglion pré-scapulaire ; GglB = ganglion bronchique ; R = rate ; GIM = glande mammaire ; E = encéphale ; V = ventricule).

|  |   |                                  |    |   |    |
|---|--|---|---|---|---|
|   | A13/1935   | A10/1279  | A09/1438  | A20/5076  | A23/5011  |
| Espèce  | <i>P. phocoena</i>   | <i>P. phocoena</i>  | <i>P. phocoena</i>  | <i>D. delphis</i>   | <i>P. vitulina</i>  |
| Code conservation   | 2  | 3   | 2   | 2   | 2   |
| Sexe et âge   | Mâle juvénile  | Mâle juvénile   | Femelle adulte  | Mâle juvénile   | Mâle juvénile   |
| Etat nutritionnel   | Bon  | Emaciation intermédiaire  | Bon   | Emaciation intermédiaire  | Emaciation intermédiaire  |
| Cause de la mort  | Origine infectieuse  | Capture accidentelle  | Capture accidentelle et/ou septicémie bactérienne   | Capture accidentelle  | Capture accidentelle  |
| Infestation parasitaire du système pulmonaire                                     | <b>Sévère</b>  | <b>Moyenne</b>  | <b>Moyenne</b>  | <b>Légère</b>   | <b>Légère</b>   |
| Etat brucellique (Pool d'organes et/ou organes « dépoolés » positifs)             | <br><b>Positif</b><br>(Pool: P/GglPré/GglB) | <br><b>Positif</b><br>(P/GglB) | <br><b>Positif</b><br>(Pool: P/GglB)<br>(GglPré/GglB/R /GIM/V/E) | <br><b>Positif</b><br>(Pool: P/GglPré) | <br><b>Positif</b><br>(Pool: P/GglPré/R) |

En plus de ces sept individus d'intérêts pour lesquels le protocole a été réalisé, deux phoques gris *Halichoerus grypus* autopsiés (A24/5024 et A24/5028) présentaient des poumons fortement parasités par de grands *O. circumlitus*, mais leur état brucellique s'était révélé négatif. A priori, ces individus n'étaient donc pas pertinents pour l'étude. Cependant, la présence significative de ces épais nématodes pulmonaires les a rendus tout de même intéressants dans le cas de cette étude. En effet, il a été décidé d'appliquer le protocole décrit dans la section

précédente sur chacun de leurs poumons, afin de vérifier si des larves peuvent être positives malgré l'absence de brucellose dans le corps de ces phoques (**Tableau 4**).

**Tableau 4.** Caractéristiques générales des individus autopsiés (parasités au niveau pulmonaire mais dont l'état brucellique est négatif). (P = poumon ; GglPré = ganglion pré-scapulaire ; GglB = ganglion bronchique ; R = rate ; GIM = glande mammaire ; E = encéphale).

|   |  <br>A24/5024 | <br>A24/5028                                      |
|---|---|--|
| Espèce  | <i>H. grypus</i>  | <i>H. grypus</i>   |
| Code conservation                             | 2   | 2  |
| Sexe et âge                                   | Femelle juvénile  | Mâle juvénile  |
| Etat nutritionnel                             | Emaciation sévère   | Emaciation sévère  |
| Cause de la mort                              | Trauma  | Emaciation sévère + trauma   |
| Infestation parasitaire du système pulmonaire | <b>Moyenne</b><br>( <i>O. circumlitus</i> )   | <b>Moyenne</b><br>( <i>O. circumlitus</i> )  |
| Etat brucellique (Pool d'organes testé)       | <br><b>Négatif</b><br>(Pool : P/GglB/GglPré/E/R)  | <br><b>Négatif</b><br>(Pool : P/GglB/GglPré/E/R) |

## 2.1. Caractéristiques des individus autopsiés

L'ensemble des caractéristiques pertinentes pour cette étude est synthétisé, par individu, dans le **Tableau 2** et **Tableau 4**.

### Phoque commun A24/5014

L'individu était une femelle juvénile de 16.7 kg, classée sous le code de conservation 2. Elle présentait une émaciation intermédiaire. Le poumon présentait un aspect très hétérogène, en mosaïque, typique d'un emphysème pulmonaire, accompagné de ganglions bronchiques hypertrophiés (adénomégalie). Un contenu séro-hémorragique résidait au niveau des bronches et ses voies respiratoires étaient légèrement infestées par des nématodes de type *Parafilaroides* spp.. La cause de la mort est probablement due à une pneumonie aigüe séro-hémorragique, ce qui a conduit l'animal au dépérissement.

### Phoque commun A24/5021

L'individu était un mâle juvénile de 14 kg, classée sous le code de conservation 2. Il présentait une émaciation sévère. Ses poumons en mosaïque indiquaient la présence d'une pneumonie,

avec un contenu hémorragique dans les voies respiratoires. Les ganglions bronchiques étaient hypertrophiés et réactifs. Ses poumons étaient infestés de manière sévère (parasitose) par *O. circumlitus* et des suspicions de thromboembolie ont été relevées. Le cœur présentait également un parasitisme sévère. L'animal était aussi atteint d'une gastro-entérite hémorragique aiguë. Il est donc probable que la mort soit d'origine infectieuse.

#### Phoque gris A24/5024

L'individu était une femelle juvénile de 22 kg environ, classée sous le code de conservation 2. Cet animal présentait une émaciation sévère. Un trait de fracture de 9 cm de long au sommet du crâne était visible ainsi qu'un hématome sous-cutané au niveau intracrânien. Certaines côtes étaient également fracturées. De nombreux caillots de sang résidaient dans la cavité abdominale et pleurale, ainsi que dans les choanes. Ses poumons étaient en mosaïque avec des zones hémorragiques et parasités par de grands nématodes de type *O. circumlitus*. Les ganglions bronchiques étaient légèrement hypertrophiés. La mort est probablement d'origine traumatique.

#### Phoque gris A24/5028

Cet individu était un mâle juvénile de 21 kg, classé sous le code de conservation 2 et présentait une émaciation sévère. Des hématomes étaient visibles entre la tête et la première vertèbre, ainsi qu'à l'entrée du thorax. Quelques caillots sanguins ont été retrouvés dans la cavité pleurale droite. Il présentait des poumons en mosaïque avec certaines zones d'emphysème avec un parasitisme moyen par des nématodes *O. circumlitus*. Il y avait également une mousse hémorragique dans la trachée. Les ganglions bronchiques étaient légèrement hypertrophiés. Deux causes de mortalités ont été relevées ; soit liée à l'émaciation, soit liée à un traumatisme.

## 2.2. Caractéristiques des individus des échantillons congelés

L'ensemble des caractéristiques pertinentes pour cette étude est synthétisé, par individu, dans le **Tableau 3**.

#### Marsouin commun A13/1935

L'individu était un mâle juvénile de 24 kg, classé sous le code de conservation 2. Il présentait un bon statut nutritionnel. L'animal était atteint d'une pneumonie chronique et aiguë avec des suspicions de thromboembolie. Ses ganglions bronchiques étaient hypertrophiés et congestifs. Le marsouin présentait une parasitose massive des voies respiratoires ainsi que des vaisseaux sanguins par des Pseudaliidae. La cause de la mort était alors probablement d'origine infectieuse.

#### Marsouin commun A10/1279

L'individu était un mâle juvénile de 27 kg, classé sous le code de conservation 3. Il présentait une émaciation intermédiaire. Une abondante mousse séro-hémorragique résidait au niveau de la trachée jusqu'aux bronches. Des nématodes de type Pseudaliidae infestaient de manière modérée les poumons. La cause de la mort est probablement une capture accidentelle car une entaille nette était visible au niveau de la nageoire pectorale gauche.

#### Marsouin commun A09/1438

L'individu était une femelle adulte de 55.5 kg, classée sous le code de conservation 2. Elle avait un bon état nutritionnel. Le poumon présentait un œdème pulmonaire sévère et une pneumonie chronique multifocale parasitaire. Effectivement, il y avait une infestation parasitaire moyenne (Pseudaliidae) des bronches et des vaisseaux pulmonaires, ainsi qu'une mousse séro-hémorragique du larynx jusqu'aux bronches profondes. Les ganglions bronchiques étaient de grande taille et congestifs. Une infestation parasitaire moyenne était également présente dans le cœur et dans le sinus peritympanique. L'animal souffrait aussi d'une angiocholite chronique focale, voire d'une hépatite aigüe. L'individu est probablement mort par capture accidentelle (marque de filet au niveau de la nageoire pectorale) et/ou septicémie bactérienne provenant du foie.

#### Dauphin commun A20/5076

L'individu était un mâle juvénile de 49 kg, classé sous le code conservation 2. Il présentait état nutritionnel intermédiaire. Des traces de filet étaient visibles au niveau du bec et de la nageoire pectorale. L'animal avait un emphysème pulmonaire généralisé ainsi que des ganglions bronchiques hypertrophiés et congestifs. Une congestion sévère des voies respiratoires avait également été relevée. Quelques nématodes Pseudaliidae infestaient les artérioles respiratoires. Le dauphin est probablement mort dans un filet mais celui-ci avait déjà un mauvais état de santé.

#### Phoque commun A23/5011

L'individu était un mâle juvénile de 21 kg, classé sous le code de conservation 2. Il présentait un état nutritionnel intermédiaire. Quelques hématomes étaient visibles au niveau du cou, ainsi qu'une forte congestion de la moelle épinière. Le poumon présentait une congestion uniforme et les ganglions bronchiques étaient hypertrophiés et congestifs. Au niveau des voies respiratoire, résidaient un abondant liquide séro-hémorragique avec quelques nématodes. L'animal est probablement mort par traumatisme (capture accidentelle).

# RÉSULTATS

## 1. Larves des poumons des individus autopsiés

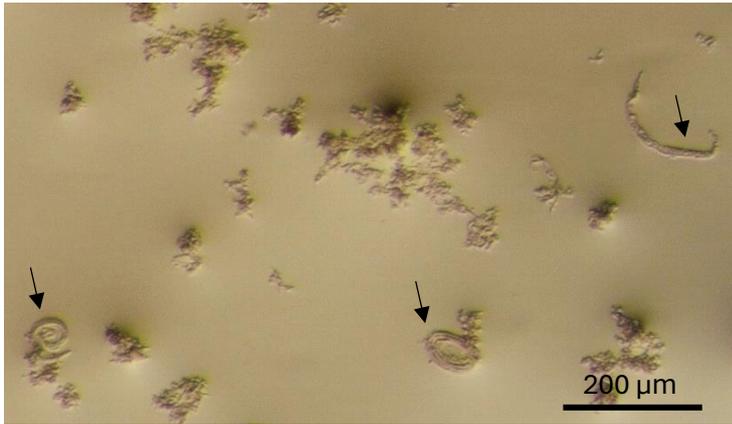
Les deux individus d'intérêt autopsiés, parasités et testés positifs à la brucellose, ont révélé la présence de larves également infectées par la bactérie (**Tableau 5**).

**Tableau 5** : Résultats PCR sur les larves pipetées des deux individus d'intérêt autopsiés.

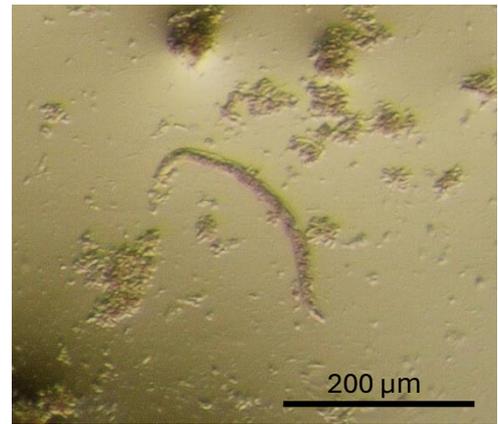
|  | <br>A24/5014                       | <br>A24/5021                      |
|---|---|--|
| Etat brucellique (Organes positifs « dépoolés »)                                  | <br>Positif<br>(P/GglPré/GglB/R/E) | <br>Positif<br>(P/GglBPré/GglB/R) |
| Nombre de larves pipetées   | 30 larves (+ quelques débris cellulaires)   | 35 larves (« pures »)  |
| PCR sur larves : test <i>Brucella</i> spp.  | <b>Positif</b><br><b>(Ct : 35,55)</b>   | <b>Positif</b><br><b>(Ct : 37,54)</b>  |

Concernant le phoque commun A24/5014, 30 larves ont été pipetées dans le filtrat obtenu après les deux filtrations successives (100 puis 70 µm). Malgré les grandes précautions prises, quelques débris cellulaires environnant ont également été pipetés. La qPCR réalisée sur l'ADN contenu dans l'Eppendorf a révélé la présence d'ADN *Brucella* spp. avec un cycle seuil de 35,55 (**Annexe 3**).

Pour le phoque A24/5021, 35 larves ont été pipetées de manière aussi pure que possible, avec très peu de débris cellulaires. Le filtrat obtenu était très riche en larves, contrairement à celui de l'individu A24/5014, qui en contenait beaucoup moins. Les larves ont été testées positives à *Brucella* spp. avec un cycle seuil de 37,54 (**Annexe 5**).



**Photo 1** : Trois larves pulmonaires de type *Parafilaroides* spp. provenant (flèches) du phoque A24/5014 (photo prise à l'aide de la loupe binoculaire Nikon SMZ800N).



**Photo 2** : Larve pulmonaire de type *O. circumlitus* provenant du phoque A24/5021 (photo prise à l'aide de la loupe binoculaire Nikon SMZ800N).

Concernant les deux phoques gris parasités au niveau des poumons mais testés négatif pour la brucellose, il est particulièrement remarquable que les larves de l'un d'eux (A24/5024) se soient tout de même révélées légèrement positives à la bactérie (**Tableau 6**). La légère détection s'explique par deux raisons : d'une part, le cycle seuil est élevé, avec une valeur de 38,22 et d'autre part, ce résultat provient d'un seul réplicat, le deuxième réplicat de cet échantillon s'étant révélé négatif (**Annexe 5**).

**Tableau 6** : Résultats PCR des larves pipetées des deux individus dont l'état brucellique s'était révélé négatif.

|   | <br>A24/5024                              | <br>A24/5028                              |
|---|--|--|
| <br>Etat brucellique<br>(Pool d'organes testé) | <br>Négatif<br>(Pool : P/GgIB/GgIPré/E/R) | <br>Négatif<br>(Pool : P/GgIB/GgIPré/E/R) |
| Nombre de larves<br>pipetées  | 30 larves<br>(« pures »)   | 31 larves<br>(« pures »)   |
| PCR sur larves : test<br><i>Brucella</i> spp.   | <b>Faiblement positif</b><br><b>(Ct : 38,22)</b>   | Négatif  |

## 2. Larves des échantillons pulmonaires congelés

Parmi les cinq individus dont les échantillons étaient disponibles dans le congélateur, deux ont présenté des larves positives à *Brucella* spp : le marsouin A13/1935 et le dauphin commun A20/5076 (Tableau 7).

**Tableau 7** : Résultats PCR sur les larves pipetées des cinq individus d'intérêt, dont les échantillons de poumons étaient congelés.

|   |  A13/1935                         |  A10/1279            |  A09/1438   |  A20/5076                    |  A23/5011                      |
|---|--|---|--|--|---|
| Etat brucellique (Pool d'organes et/ou organes « dépoolés » positifs) | <br>Positif (Pool: P/GglPré/GglB) | <br>Positif (P/GglB) | <br>Positif (Pool: P/GglB) (GglPré/GglB/R /GIM/V/E) | <br>Positif (Pool: P/GglPré) | <br>Positif (Pool: P/GglPré/R) |
| Nombre de larves pipetées   | 28 larves (« pures »)  | 35 larves (+ quelques débris cellulaires)   | 10 larves (+ amas cellulaires)   | 10 larves (+ amas cellulaires)   | 30 larves (+ quelques débris cellulaires)   |
| PCR sur larves : test <i>Brucella</i> spp.                            | <b>Positif (Ct : 37,60)</b>  | Négatif   | Négatif  | <b>Positif (Ct : 34,64)</b>  | Négatif   |

Après les deux filtrations consécutives, une grande quantité de filtrat a été récupérée de l'échantillon pulmonaire A13/1935. Cela indique la présence abondante de débris cellulaires en plus des larves, malgré les deux étapes de filtration. Toutefois, 28 larves ont été pipetées dans l'Eppendorf, avec très peu de débris cellulaires environnants. La qPCR réalisée sur l'ADN extrait des larves a détecté la présence d'ADN *Brucella*, avec un cycle seuil de 37,60 (Annexe 4).



**Photo 3** : Larve pulmonaire de type Pseudaliidae provenant du marsouin A13/1935 (photo prise à l'aide de la loupe binoculaire Nikon SMZ800N).

Concernant le morceau de poumon de l'individu A20/5076, le filtrat était également très important. Cependant, il contenait très peu de larves, ce qui a rendu l'étape du pipetage très difficile car de nombreux amas cellulaires et débris aggloméraient les larves présentes. Au total, seulement environ 10 larves ont été pipetées. La qPCR réalisée sur l'ADN contenu dans l'Eppendorf a révélé la présence d'ADN *Brucella* avec un cycle de seuil de 34,64 (**Annexe 3**).

Les larves provenant des échantillons pulmonaires A10/1279, A09/1438 et A23/5011 n'ont pas été révélées positives à *Brucella* spp. (**Annexe 3**). Pour l'échantillon A10/1279, une grande quantité de filtrat a été obtenue après les deux filtrations successives, permettant de pipeter 35 larves. De manière similaire, pour l'échantillon A23/5011, 30 larves ont été pipetées.

En revanche, l'échantillon pulmonaire A09/1438 a fourni un très petit culot après les filtrations, avec peu de contenu. Cet échantillon contenait très peu de larves, tout comme l'échantillon A13/1935. Dans ce cas, environ 10 larves ont été pipetées.

La transmission vectorielle de *Brucella* spp. par les nématodes pulmonaires représente une des voies possibles par lesquelles cette bactérie peut infecter les mammifères marins, bien que cela n'a pas encore été entièrement élucidé (Lehnert *et al.*, 2010 ; Lambourn *et al.*, 2013 ; Rhyan *et al.*, 2018).

Cette étude, visant à vérifier si les larves de premier stade L1 infestant le poumon du mammifère marin sont infectées par *Brucella* spp., a permis d'obtenir quelques données intéressantes qui pourraient renforcer l'hypothèse de transmission vectorielle. Ce travail a en effet abouti à cinq résultats positifs sur neuf individus testés, montrant que les larves L1 sont probablement porteuses de *Brucella* spp. Parmi ces cinq individus, quatre présentaient un état brucellique positif, ce qui correspond à une corrélation attendue. Quant au cinquième individu, qui avait été testé négatif pour la brucellose, les larves prélevées dans ses poumons se sont tout de même révélées légèrement positives.

### **1. Positivité des larves chez les individus positifs à la brucellose**

Ces résultats ont révélé la présence de larves porteuses de *Brucella* spp. chez quatre des sept individus parasités présentant une brucellose de manière systémique.

Concernant les deux phoques communs autopsiés, les larves provenant du phoque A24/5014 semblent contenir une quantité plus importante d'ADN de *Brucella* spp., comme en témoigne un cycle seuil légèrement plus faible (35,55) par rapport au phoque A24/5021 (37,54). Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que quelques débris cellulaires pulmonaires ont malencontreusement été inclus lors du pipetage chez l'individu A24/5014, ce qui pourrait potentiellement fournir un plus grand nombre de souches bactériennes, d'autant plus que le poumon est un organe positif à la bactérie chez ce phoque.

Quant aux cinq individus pour lesquels les échantillons de poumons étaient accessibles au congélateur, les larves de deux d'entre eux se sont également révélées porteuses de la bactérie ; le marsouin commun A13/1935 et le dauphin commun A20/5076. Dans ce cas, ce sont les larves du dauphin A20/5076 qui contiendraient une quantité plus importante d'ADN brucellique car le cycle seuil associé est de 34,64 contre 37,60 chez le marsouin A13/1935. Cette différence ne peut s'expliquer par un plus grand nombre de larves pipetées chez l'individu A20/5076, car

seulement 10 larves avaient été pipetées, contre 28 chez le marsouin A13/1935. Cependant, chez le dauphin A20/5076, de nombreux amas cellulaires et débris aggloméraient les 10 larves pipetées, ce qui pourrait avoir influencé le résultat en apportant des souches *Brucella* spp. via ces débris. Néanmoins, le résultat négatif des 10 larves pipetées chez l'individu A09/1438, également agglomérées à de nombreux amas cellulaires et provenant aussi d'un individu *Brucella*-positif, rassure quant à l'impact des débris cellulaires sur le résultat PCR final.

La présence de *Brucella* spp. dans les larves de stade L1 a déjà été démontrée par immunohistochimie chez des phoques infectés par la brucellose (Rhyan *et al.*, 2018). Les larves L4, uniquement présentes dans les poumons des mammifères marins (Cfr. 4.5. Cycle des vers pulmonaires chez les mammifères marins) ont aussi été testées positives par Rhyan et son équipe. Dans cette présente étude, seules les larves L1 ont été testées, étant donné que les deux filtrations successives effectuées dans le protocole éliminent les larves L4. Bien que certaines larves L1 infectées aient été prélevées du gros intestin des mammifères marins dans d'autres travaux (Rhyan *et al.*, 2018), toutes les larves L1 testées dans cette étude proviennent uniquement des poumons. Ce choix s'explique par le fait que la reproduction des nématodes et donc l'éclosion des larves L1 s'effectuent dans les poumons, faisant cet organe la source la plus probable et la plus abondante de larves L1.

## 2. Positivité des larves chez l'individu négatif à la brucellose

Le cas du phoque gris A24/5024, dont l'état brucellique a été révélé négatif tandis que ses larves ont montré une légère positivité, contredit la littérature existante. En effet, celle-ci affirme que tous les nématodes *Brucella*-positifs sont observés chez des individus présentant eux-mêmes un état brucellique positif (Fischbach et Seguel, 2023). Le test PCR sur le pool d'organes (poumon, encéphale, rate, ganglions préscapulaire et bronchique) de cet individu s'est effectivement révélé négatif. Le fait que la PCR ait détecté de l'ADN brucellique dans les larves remet en question l'efficacité du test sur le pool d'organes et/ou la manière dont la transmission vectorielle de la brucellose s'effectue chez les mammifères marins.

La remise en question de l'efficacité du test « pool » provient de la possibilité que l'individu A24/5024 aurait pu présenter des organes positifs à *Brucella* spp., mais que les échantillons utilisés pour les analyses PCR ne contenaient pas la bactérie. En effet, les fragments d'organes utilisés pour les tests « pool » sont de petite taille et pourraient ne pas inclure la bactérie, alors

que les organes entiers pourraient la contenir et donc être infectés. Ces tests « pools » posent donc une limite à l'étude (Cfr. 4. **Limites de l'étude**).

Ce cas soulève aussi des questionnements quant à la manière dont *Brucella* spp. se transmet par les vers pulmonaires chez les mammifères marins. Deux scénarios possibles sont envisageables (Prenger-Berninghoff *et al.*, 2008 ; Rhyan *et al.*, 2018) :

- 1) Les larves s'infectent en se logeant dans un milieu déjà infecté, tel que le poumon.
- 2) L'infection est portée par les larves, ingérées par le mammifère marin, et infectent ensuite le poumon de l'individu.

Pour déterminer le meilleur scénario, il serait pertinent de tester les larves enkystées chez les hôtes intermédiaires (poissons et /ou invertébrés marins) afin de vérifier si elles sont déjà porteuses de la bactérie avant d'être ingérées par le mammifère marin. Si les résultats sont positifs, cela renforcerait le deuxième scénario. C'est effectivement ce deuxième scénario qui soutient l'hypothèse de la transmission vectorielle de *Brucella* spp. par les vers pulmonaires, car ce sont ces derniers qui apporteraient l'infection au mammifère marin. Dans le cas du premier scénario, les nématodes s'infectent de manière « accidentelle » dans le poumon, et ne constitueraient alors pas une voie principale de transmission. Cependant, quel que soit le scénario, les larves infectées disséminent la bactérie au cours de leur cycle de vie débutant et finissant dans le mammifère marin, ce qui suggère qu'elles sont tout de même responsables de la contamination interne de l'individu (Rhyan *et al.*, 2018).

Le cas du phoque gris A24/5024 semble plutôt appuyer le deuxième scénario. En effet, les résultats du test « pool » ont révélé une négativité des organes, y compris les poumons. Il est possible que les larves, bien que légèrement positives, n'aient pas encore eu le temps d'infecter le poumon du phoque. Garner et son équipe ont également avancé que l'exposition aux nématodes infectés est à l'origine de l'infection pulmonaire, ce qui soutient également le deuxième scénario (Garner *et al.*, 1997).

### **3. Négativité des larves chez les individus positifs à la brucellose**

D'après les résultats, les larves pulmonaires des individus A10/1279, A09/1438 et A23/5011, ne seraient pas infectées par *Brucella* spp., bien que ces individus soient positifs à la brucellose. A priori, cela suggère qu'ils ont contracté la bactérie par les deux autres voies possibles,

verticalement et/ou horizontalement, ce qui implique que les larves ne sont donc pas responsables de la contamination et n'appuie donc pas l'hypothèse d'une transmission vectorielle. Cependant, il est également possible que ces échantillons de larves soient des « faux-négatifs », ce qui pourrait s'expliquer par différentes raisons :

- Les échantillons de poumons des individus A10/1279 et A09/1438, datant respectivement de 2010 et 2009, pourraient être trop anciens pour que l'ADN de *Brucella* spp. soit resté intact dans les larves, empêchant ainsi sa détection par PCR (Cfr. 4. Limites de l'étude).

- Une autre possibilité, bien que moins probable, est que les larves pipetées, au nombre d'une trentaine, ne contenaient pas la bactérie et ne représentaient pas l'ensemble des larves pulmonaires infestant le poumon, dont certaines pourraient être porteuses de *Brucella* spp.

## 4. Limites de l'étude

### 4.1. Nombre d'individus étudiés

Pour identifier les individus d'intérêt (positifs pour *Brucella* spp.), un test PCR-*Brucella* est effectué en parallèle sur un pool d'échantillons (poumon, rate, encéphale, ganglions préscapulaire et bronchique) de chaque individu autopsié. L'étude s'est donc concentrée uniquement sur les individus dont le test « pool » était positif à la bactérie. Cette approche limite le nombre d'individus d'intérêt (et donc étudiés), car certains auraient pu ne pas être détectés positifs via ce test « pool », sachant que la bactérie peut être présente de manière focale dans les organes (Leibovitz *et al.*, 2016). Dès lors, les fragments d'organes utilisés pour les tests « pool » pourraient ne pas inclure la bactérie, alors que les organes entiers pourraient la contenir.

### 4.2. Mode de conservation

#### 4.2.1. Congélation

En plus des échantillons conservés au congélateur, certains des individus autopsiés ont initialement été congelés, exposant ainsi les tissus, y compris les larves présentes dans le tissu pulmonaire, à des événements de congélation et de décongélation. Les processus de gel et de dégel favorisent la dégradation de l'ADN, y compris celui des bactéries telles que *Brucella* spp. Lors de la congélation, la formation de cristaux de glace endommage les membranes cellulaires et fragmente l'ADN, pouvant ainsi réduire la qualité de l'ADN extrait des larves. Bien que peu probable, la fiabilité et la sensibilité de la détection de *Brucella* spp. par PCR pourraient être

compromises en raison de fragments d'ADN-*Brucella* qui seraient incomplets ou endommagés (Duarte *et al.*, 2009 ; Naze *et al.*, 2015). Il est donc important de limiter au maximum les cycles de congélation et de décongélation afin de maintenir au mieux l'ADN bactérien au niveau des larves.

Cependant, la détection positive de *Brucella* spp. dans les larves pulmonaires de l'échantillon A13/1935, datant de 2013, confirme la stabilité de l'ADN de cette bactérie même après plus d'une décennie passée dans un congélateur. Ce résultat rassure quant à la problématique de la congélation et démontre la capacité de l'ADN bactérien à persister au fil du temps, malgré les cycles potentiels de congélation et de décongélation qu'il aurait pu subir lors de ces années.

#### 4.2.2. Ethanol glycérolé

L'année dernière en 2023, des larves issues d'un échantillon de poumon congelé d'un marsouin commun référencé A21/5063 avaient déjà été isolées et avaient été testées positives pour *Brucella* spp. (**Annexe 2**) (De Trez, 2023). En début de ce stage, ces mêmes larves ont été retestées par PCR dans le but de s'exercer, mais étonnamment, aucun signal *Brucella* spp. ni même aucun signal ADN n'a été détecté. Cette absence de détection pourrait s'expliquer par le fait que les larves, censées être positives, avaient été stockées dans de l'éthanol glycérolé durant une année, ce qui aurait probablement altéré l'ADN de *Brucella* spp. au sein des larves.

Effectivement, les solvants à base d'éthanol est souvent utilisé en tant qu'agent de conservation pour préserver les échantillons à court terme. Cependant, à long terme, un tel solvant pourrait altérer les structures biologiques telles que l'ADN (Hammer *et al.*, 2012 ; Chung *et al.*, 2018 ; Panzacchi *et al.*, 2019).

### 4.3. Biais provoqué par les débris cellulaires pulmonaires

Malgré les deux filtrations successives (100 puis 70 µm), une grande quantité de débris et amas cellulaires pulmonaires persiste dans le filtrat. Cela s'explique par l'étape de « shaking », destinée à laver le poumon pour récolter des larves, mais qui favorise également la récupération de toutes cellules pulmonaires desquamées. Ainsi, lors du pipetage des larves une par une, quelques amas et débris cellulaires sont également aspirés dans la pipette Pasteur malgré les précautions pour les éviter, introduisant ainsi un biais dans cette étude. En effet, cela soulève des doutes quant à savoir si *Brucella* spp. détectée dans les échantillons provient réellement des larves, des débris, ou peut-être des deux à la fois. Cependant, le fait que certains individus pour

qui l'échantillon de larves s'est révélé négatif malgré des poumons positifs est rassurant. Cela suggère que les débris cellulaires pulmonaires n'ont pas tellement influencé le résultat final.

Pour évaluer l'impact des débris cellulaires pulmonaires sur le résultat final, deux pipetages de pureté différente ont été réalisés sur l'échantillon A24/5021. Un Eppendorf, noté « A24/5021 +++ », contenait 35 larves avec beaucoup de débris cellulaires, tandis qu'un autre, noté « A24/5021 --- », contenait également 35 larves mais avec très peu de débris (**Annexe 5**). La PCR réalisée sur l'échantillon A24/5021+++ a détecté la présence de *Brucella* spp. avec un cycle seuil de 34,64 alors que l'échantillon A24/5021---, contenant les larves quasiment pures, a présenté un cycle seuil de 37,54. Cela montre que les débris cellulaires peuvent introduire du matériel génétique supplémentaire de la bactérie, qui n'est pas celui contenu dans les larves. Cependant, la différence entre les deux reste relativement faible.

Pour limiter l'apport de débris susceptibles de contenir des souches *Brucella* spp. et donc d'influencer les résultats, l'isolement des larves par pipetage pourrait bénéficier d'améliorations (Cfr. 4.3.1. [Pipetage des larves en deux temps](#)). Afin de confirmer que l'ADN *Brucella* spp. détecté par qPCR provient effectivement des larves, l'immunohistochimie représenterait une solution idéale pour localiser précisément la présence de la bactérie (Cfr. 4.3.2. [Immunohistochimie](#)). Enfin, il serait intéressant d'établir un procédé supplémentaire consistant à récupérer les larves à partir de l'utérus des nématodes femelles plutôt que des poumons (Cfr. 4.3.3. [Implication des larves dans l'utérus des nématodes femelles](#)).

#### 4.3.1. [Pipetage des larves en deux temps](#)

Pour améliorer la pureté des échantillons de larves, il serait alors pertinent d'ajouter au protocole, un pipetage en deux temps. Plutôt que de réaliser un seul pipetage et de pipeter directement les larves du filtrat (riche en débris cellulaires) obtenu après les deux filtrations pour ensuite effectuer la PCR, une deuxième étape de pipetage pourrait être ajoutée. Le premier pipetage, tel que réalisé dans cette étude, permettrait donc de recueillir un contenu de larves et de quelques débris cellulaires qui auraient également été aspirés. Le second pipetage consisterait alors à pipeter dans ce contenu, déjà partiellement débarrassé des débris cellulaires. Ainsi, ce double pipetage permettrait d'éliminer au maximum les débris cellulaires pulmonaires, ce qui améliorerait alors la précision des résultats PCR en ne sélectionnant que les larves.

#### 4.3.2. Immunohistochimie

Contrairement aux méthodes d'immunohistochimie qui peuvent localiser spécifiquement *Brucella* spp., les techniques qPCR mises en œuvre dans cette étude ne permettent pas une telle localisation. La qPCR, bien qu'elle soit efficace pour amplifier même de très faibles quantités d'ADN, ne fournit pas d'informations sur l'emplacement précis de la bactérie. Pour les cinq résultats positifs de cette étude, il reste donc incertain si l'ADN *Brucella* spp. amplifié provient des débris cellulaires pipetés avec les larves, des larves elles-mêmes, ou des deux à la fois. Privilégier l'analyse immunohistochimique des échantillons de larves serait donc préférable à l'utilisation des techniques PCR, car elle permettrait de confirmer si la bactérie provient réellement des larves. Cependant, en raison du manque actuel d'anticorps spécifiques à la faculté, le protocole est limité à la réalisation de PCR.

#### 4.3.3. Implication des larves dans l'utérus des nématodes femelles

Alors que cette étude se concentre uniquement sur l'ADN des larves récupérées à partir du « shaking » des poumons, générant une solution riche en débris cellulaires pulmonaires, il serait pertinent d'étudier également les larves présentes dans l'utérus des nématodes femelles. De ce fait, en pipétant ces larves, sans l'aspiration de débris cellulaires pulmonaires, l'ADN extrait serait exclusivement celui contenu dans les larves elles-mêmes.

## CONCLUSION (ET PERSPECTIVES)

---

Trois décennies se sont écoulées depuis la découverte de la brucellose chez les mammifères marins, pourtant la voie de transmission de *Brucella* spp. chez ces animaux n'est toujours pas totalement élucidée. Les vers pulmonaires, par leur cycle de vie, semblent jouer un rôle important dans la contraction de *Brucella* spp., en raison de la présence de leurs larves de premier stade L1 dans le milieu marin, se retrouvant ensuite dans le corps du mammifère. Cette étude s'est donc penchée sur l'analyse des larves de stade L1 d'individus d'intérêts pour déterminer si elles étaient infectées par la bactérie. Les résultats ont montré que cinq individus sur neuf présentaient des larves probablement porteuses de *Brucella* spp. renforçant ainsi l'hypothèse de transmission vectorielle.

Cependant, pour confirmer cette théorie, il faudrait vérifier si les nématodes ingérés sont déjà porteurs de la bactérie avant d'infecter le mammifère ou s'ils s'infectent dans le poumon déjà contaminé. Il est également envisageable que les nématodes ingérés soient déjà infectés et que le poumon le soit aussi par les deux autres voies de transmissions possibles. Avoir une compréhension complète de la transmission vectorielle de *Brucella* spp., nécessite une meilleure connaissance de la relation entre l'infection des vers pulmonaires et des poissons et/ou invertébrés marins. Pour ce faire, identifier la bactérie dans les larves chez ces hôtes intermédiaires permettrait d'apporter des éléments supplémentaires pour élucider leur rôle potentiel dans la transmission de la bactérie chez les mammifères marins.

Pour des études ultérieures, il serait également intéressant d'inclure les individus négatifs autant que ceux positifs à la brucellose. En effet, comme le montre ce travail, les larves peuvent être infectées même chez des hôtes n'ayant pas été relevés comme positifs, apportant ainsi des informations pertinentes sur la manière dont se transmet *Brucella* spp. chez le mammifère. De plus, l'immunohistochimie, qui n'a pas été réalisée dans cette étude, pourrait apporter une précision supplémentaire en déterminant si la bactérie provient bien des larves et non pas du milieu environnant, tel que les débris cellulaires pulmonaires. Pour limiter ces derniers, il serait essentiel d'ajouter un pipetage en deux temps au protocole, ou encore de pipeter les larves directement à partir de l'utérus des nématodes adultes femelles.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Celli J., 2019. The Intracellular Life Cycle of *Brucella* spp. *Microbiology Spectrum*, 7, BAI-0006-2019.
- Chung J-Y., Song J.S., Ylaya K., Sears J.D., Choi L., Cho H., Rosenberg A.Z., Hewitt S.M., 2018. Histomorphological and Molecular Assessments of the Fixation Times Comparing Formalin and Ethanol-based Fixatives. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 66, 121-135.
- Cohen R.E., James C.C., Lee A., Martinelli M.M., Muraoka W.T., Ortega M., Sadowski R., Starkey L., Szesciorka A.R., Timko S.E., Weiss E.L., Franks P.J.S., 2018. Marine Host-Pathogen Dynamics: Influences of Global Climate Change. *Oceanography*, 31, 182-193.
- Colegrove K.M., Burek-Huntington K.A., Roe W., Siebert U., 2018. Chapter 23, Pinnipediae. In *Pathology of Wildlife and Zoo Animals*. Terio K.A., McAloose D., St. Leger J., (eds). Academic Press, 569-592.
- Dagleish M.P., Berley 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.
- Dailey M.D., 2006. Restoration of *Parafilaroides* (Dougherty, 1946) (Nematoda: Metastrongyloidea) with Description of Two New Species from Pinnipeds of Eastern Central Pacific. *Journal of Parasitology*, 92, 589-594.
- Dailey M.D., 2009. A New Species of *Parafilaroides* (Nematoda: Filaroididae) in Three Species of Fur Seals (Carnivora: Otariidae) from the Southern Hemisphere. *Journal of Parasitology*, 95, 1.
- Davison N.J., Dagleish M.P., ten Doeschate M., Muchowski J., Perrett L.L., Rocchi M., Whatmore A.M., Brownlow A., 2021. Meningoencephalitis in a Common Minke Whale *Balaenoptera acutorostrata* Associated with *Brucella pinnipedialis* and Gamma-Herpesvirus Infection. *Diseases of Aquatic Organisms*, 144, 231-235.
- Dawson C.E., Perrett L.L., Stubberfield E.J., Stack J.A., Farrelly S.S.J., Cooley W.A., Davison N.J., Quinney S., 2008. Isolation and Characterization of *Brucella* from the Lungworms of a Harbor Porpoise (*Phocoena phocoena*). *Journal of Wildlife Diseases*, 44, 237-246.
- De Figueiredo P., Ficht A.T., Rice-Ficht A., Rossetti C.A., Adams L.G., 2015. Pathogenesis and Immunobiology of Brucellosis: Review of *Brucella*-Host Interactions. *The American Journal of Pathology*, 185, 6.
- De Vere A., Lilley M., Frick E.E., 2018. Anthropogenic Impacts on the Welfare of Wild Marine Mammals. *Aquatic Mammals*, 44, 150-180.
- Duncan C.G., Tiller R., Mathis D., Stoddard R., Kersh G.J., Dickerson B., Gelatt T., 2014. *Brucella* Placentitis and Seroprevalence in Northern Fur Seals (*Callorhinus Ursinus*) of the Pribilof Islands, Alaska. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 26, 507-512.
- Dunn J.L., Buck J.D., Robeck T.R., 2001. Chapter 16, Bacterial Diseases of Cetaceans and Pinnipeds. In *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine*. Dierauf L.A., Gulland F.M.D., (eds). CRC Press, 309-328.
- Duarte R.C., Araujo M.M., Salum D.C., Marchioni E., Villavicencio A.L.C.H., 2009. Effects of the Ionizing Radiations, Freezing and Thawing Duration on Chicken Liver Cells Quality. *Radiation Physics and Chemistry*, 78, 631-634.

- Elizalde-Bielsa A., Aragón-Aranda B., Loperena-Barber M., Salvador-Bescós M., Moriyón I., Zúñiga-Ripa A., Conde-Álvarez R., 2023. Development and Evaluation of the *Galleria mellonella* (Greater Wax Moth) Infection Model to Study *Brucella* Host-Pathogen Interaction. *Microbial Pathogenesis*, 174, 105930.
- Elson-Riggins J.G., Gibbons L.M., Van Liere D.W., Zinkstok E.W., Blake D.P., Alegre F., Spittle H., Brakefield P.M., Udo de Haes H.A., Osinga N., 2020. Surprisingly Long Body Length of the Lungworm *Parafilaroides gymmurus* from Common Seals of the Dutch North Sea. *Parasitology Research*, 119, 1803-1817.
- Fischbach J.R., Seguel M., 2023. A Systematic Review of the Diversity and Virulence Correlates of Metastrongyle Lungworms in Marine Mammals. *Parasitology*, 150, 1178-1191.
- Foster G., Jahans K.L., Reid R.J., Ross H.M., 1996. Isolation of *Brucella* Species from Cetaceans, Seals and an Otter. *The Veterinary Record*, 138, 583-586.
- Foster G., MacMillan A.P., Godfroid J., Howie F., Ross H.M., Cloeckaert A., Reid R.J., Brew S., Patterson I.A.P., 2002. A Review of *Brucella* sp. Infection of Sea Mammals with Particular Emphasis on Isolates from Scotland. *Veterinary Microbiology*, 90, 563-580.
- Foster G., Osterman B.S., 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.
- Foster G., Nymo I.H., Kovacs K.M., Beckmen K.B., Brownlow A.C., Baily J.L., Dagleish M.P., Muchowski J., Perrett L.L., Tryland M., Lydersen C., Godfroid J., McGovern B., Whatmore A.M., 2018. First Isolation of *Brucella pinnipedialis* and Detection of *Brucella* Antibodies from Bearded Seals *Erignathus barbatus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 128, 13-20.
- Garner M.M., Lambourn D.M., Jeffries S.J., Hall P.B., Rhyan J.C., Ewalt D.R., Polzin L.M., Cheville N.F., 1997. Evidence of *Brucella* Infection in *Parafilaroides* Lungworms in a Pacific Harbor Seal (*Phoca vitulina*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 9, 298-303.
- Geerinckx L., Jonker A., Van Brantegem L., De Laender P., De Wilde N., Claerebout E., Chiers K., 2021. Lungworm Infection with *Otostrongylus circumlitus* in a Free-Ranging Harbor Seal (*Phoca vitulina*). *Vlaams Diergeeneeskundig Tijdschrift*, 90.
- Godfroid J., Nymo I.H., Tryland M., Cloeckaert A., Jauniaux T., Whatmore A.M., Moreno E., Foster G., 2012. Chapter 18, *Brucella ceti* and *Brucella pinnipedialis* infections in Marine Mammals. In *New Directions in Conservation Medicine: Applied Cases of Ecological Health*. Aguirre A.A., Ostfeld R., Daszak P., (eds). Oxford University Press, 639.
- González-Espinoza G., Arce-Gorvel V., Mémet S., Gorvel J.P., 2021. *Brucella*: Reservoirs and Niches in Animals and Humans. *Pathogens*, 10, 186.
- Groussaud P., Shankster S.J., Koyle M.S., Whatmore A.M., 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., Gonzalez-Barrientos R., Hernandez-Mora G., Morales J-A., Baquero-Calvo E., Chaves-Olarte E., Moreno E., 2012. *Brucella ceti* and Brucellosis in Cetaceans. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 3.

- Haelters J., Moreau K., (Team SeaLife), Jauniaux T., Kerckhof F., 2021. Échouages et Observations de Mammifères Marins en Belgique en 2021. Institut royal des Sciences naturelles de Belgique (IRSNB), Bruxelles.
- Haelters J., Kerckhof F., 2023. Mammifères Marins et Tortues Marines en Belgique en 2023. Institut des Sciences naturelles (IRSNB), Bruxelles.
- Hammer N, Löffler S., Feja C., Sandrock M., Schmidt W., Bechmann I., Steinke H., 2012. Ethanol-Glycerin Fixation with Thymol Conservation: A Potential Alternative to Formaldehyde and Phenol Embalming. *Anatomical Sciences Education*, 5, 225-233.
- Hernández-Mora G, Gonzalez-Barrientos R., Morales J-A., Chaves-Olarte E., Guzman-Verri C., Baquero-Calvo E., De Miguel M-J., Marin C-M., Blasco J-M., Moreno E., 2008. Neurobrucellosis in Stranded Dolphins, Costa Rica. *Emerging Infectious Disease*, 14, 9.
- Hernández-Mora G., Palacios-Alfaro J.D., Gonzalez-Barrientos R., 2013. Wildlife Reservoirs of *Brucellosis*: Brucella in aquatic environments. *Revue scientifique et technique - Office international des epizooties*, 32, 89-1003.
- Higgins R., 2000. Bacteria and Fungi of Marine Mammals: a Review. *The Canadian Veterinary Journal*, 41, 105-116.
- Howard E.B., Britt J.O., Matsumoto G., 1998. Chapter 5, Parasitic Diseases. In *Pathobiology of Marine Mammals Diseases*. Howard E.B. (eds). CRC Press, pp. 119-231.
- Jauniaux T.P., Brenez C., Fretin D., Godfroid J., Haelters J., Jacques T., Kerckhof F., Mast J., Sarlet M., Coignoul F.L., 2010. *Brucella ceti* Infection in Harbor Porpoise (*Phocoena phocoena*). *Emerging Infectious Diseases*, 16, 12.
- Kurmanov B., Zincke D., Su W., Hadfield T.L., Aikimbayev A., Karibayev T., Berdikulov M., Orynbayev M., Nikolich M.P., Blackburn J.K., 2022. Assays for Identification and Differentiation of *Brucella* Species: A Review. *Microorganisms*, 10, 1584.
- Lambourn D.M., Garner M., Ewalt D., Raverty S., Sidor I., Jeffries S.J., Rhyan J., Gaydos J.K., 2013. *Brucella pinnipedialis* Infections in Pacific Harbor Seals (*Phoca vitulina richardsi*) from Washington State, USA. *Journal of Wildlife Diseases*, 49, 802–815.
- Lehnert K., von Samson-Himmelstjerna G., Schaudien D., Bleidorn C., Wohlsein P., Siebert U., 2010. Transmission of Lungworms of Harbour Porpoises and Harbour Seals. *International Journal for Parasitology*, 40, 845-853.
- Leibovitz E., David N., Ribitzky-Eisner H., Madegam M.A., Abuabed S., Chodick G., Maimon M., Fruchtman Y., 2016. The Epidemiologic, Microbiologic and Clinical Picture of Bacteremia among Febrile Infants and Young Children Managed as Outpatients at the Emergency Room, before and after Initiation of the Routine Anti-Pneumococcal Immunization. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13, 723.
- Leidenberger S., Boström S., 2009. Description of the Lungworm *Otostrongylus circumlitus* (Railliet, 1899) de Bruyn, 1933 (Metastrongyloidea: Crenosomatidae) Found in the Heart of Harbour Seals from Sweden. *Journal of Nematode Morphology and Systematics*, 12, 169-175.
- Maio E., Begeman L., Bisselink Y., van Tulden P., Wiersma L., Hiemstra S., Ruuls R., Gröne A., Roest H-I-J., Willemsen P., van der Giessen J., 2014. Identification and Typing of *Brucella* Spp. in Stranded Harbour Porpoises (*Phocoena phocoena*) on the Dutch Coast. *Veterinary Microbiology*, 173, 118-124.

- Maratea J., Ewalt D.R., Frasca S., Dunn J.L., De Guise S., Szkudlarek L., St. Aubin D.J., French R.A., 2003. Evidence of *Brucella* sp. Infection in Marine Mammals Stranded along the Coast of Southern New England. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 34, 256-261.
- Measures L.N., 2001. Lungworms of Marine Mammals. *Parasitic Diseases of Wild Animals*, 279-300.
- Naze F., Desvars A., Picardeau M., Bourhy P., Michault A., 2015. Use of a New High Resolution Melting Method for Genotyping Pathogenic *Leptospira* spp. *Journal Plos One*, 10, e0127430.
- Nymo I.H., Tryland M., Godfroid J., 2011. A Review of *Brucella* Infection in Marine Mammals, with Special Emphasis on *Brucella pinnipedialis* in the Hooded Seal (*Cystophora cristata*). *Veterinary Research*, 42, 93.
- Orsini M., Ianni A., Zinzula L., 2022. *Brucella ceti* and *Brucella pinnipedialis* Genome Characterization Unveils Genetic Features That Highlight Their Zoonotic Potential. *MicrobiologyOpen*, 11, e1329.
- Panzacchi S., Gnudi F., Mandrioli D., Montella R., Strollo V., Merrick B.A., Belpoggi F., Tibaldi E., 2019. Effects of Short and Long-Term Alcohol-based Fixation on Sprague-Dawley Rat Tissue Morphology, Protein and Nucleic Acid Preservation. *Acta Histochemica*, 121, 750-760.
- Perrett L.L., Dawson C.E., Davison N., Quinney S., 2004. *Brucella* Infection of Lungworms from a Harbour Porpoise. *Veterinary Record*, 154, 800.
- Pool R., Shiozaki A., Raga J.A., Fernandez M., Aznar F.J., 2023. Molecular Phylogeny of the Pseudaliidae (Nematoda) and the Origin of Associations between Lungworms and Marine Mammals. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 20, 192-202.
- Prenger-Berninghoff E., Siebert U., Stede M., König 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.
- Reckendorf A., Everaarts E., Bunskoek P., Haulena M., Springer A., Lehnert K., Lakemeyer J., Siebert U., Strube C., 2021. Lungworm Infections in Harbour Porpoises (*Phocoena phocoena*) in the German Wadden Sea between 2006 and 2018, and Serodiagnostic Tests. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 14, 53-61.
- Rhyan J., Garner M., Spraker T., Lambourn D., Cheville N., 2018. *Brucella pinnipedialis* in Lungworms *Parafilaroides* Sp. and Pacific Harbor Seals *Phoca vitulina*: Proposed Pathogenesis. *Diseases of Aquatic Organisms*, 131, 87-94.
- Sanderson C.E., Alexander K.A., 2020. Uncharted Waters: Climate Change Likely to Intensify Infectious Disease Outbreaks Causing Mass Mortality Events in Marine Mammals. *Global Change Biology*, 26, 4284-4301.
- Sohn A.H., Probert W.S., Glaser C.A., Gupta N., Bollen A.W., Wong J.D., Grace E.M., McDonald W.C., 2003. Human Neurobrucellosis with Intracerebral Granuloma Caused by a Marine Mammal *Brucella* spp. *Emerging Infectious Diseases*, 9, 485-488.
- Spickler A.R., 2018. *Brucellosis in Marine Mammals*. The Center for Food Security and Public Health.
- Thakur S.D., Vaid R.K., Panda A.K., Saini Y., 2012. Marine Mammal Brucellosis: A New Dimension to an Old Zoonosis. *Current Science*, 103, 8.
- Van Bresseem M-F., Raga J.A., Di Guardo G., Jepson P.D., Duignan P.J., Siebert U., Barrett T., de Oliveira Santos M.C., Moreno I.B., Siciliano S., Aguilar A., Va, Waerebeek K., 2009. Emerging

Infectious Diseases in Cetaceans Worldwide and the Possible Role of Environmental Stressors. Diseases of Aquatic Organisms, 86, 143-157.

- Vargas-Castro I., Crespo-Picazo J.L., Fayos M., Jiménez-Martínez M.L.A., Torre-Fuentes L., Álvarez J., Moura A.E., Hernández M., Buendía A., Barroso-Arévalo S., García-Seco T., Pérez-Sancho M., De Miguel M.J., Andrés-Barranco S., Marco-Cabedo V., Peñin-Villahoz G., Muñoz P.M., Domínguez L., García-Párraga D., Sánchez-Vizcaíno J.M., 2023. New Insights into the Pathogenesis and Transmission of *Brucella pinnipedialis*: Systemic Infection in Two Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*). Microbiology Spectrum, e01997-23.
- Waltzek T.B., Cortés-Hinojosa G., Wellehan F.F.X., Gray G.C., 2012. Marine Mammal Zoonoses: a Review of Disease Manifestations. Zoonoses and Public Health, 59, 521-535.
- Whatmore A.M., Dawson C., Groussaud P., Koylass M., King A., Shankster S.J., Sohn A.H., Probert W.S., McDonald W.L., 2008. Marine Mammal *Brucella* Genotype Associated with Zoonotic Infection. Emerging Infectious Diseases, 14, 3.
- Whatmore A.M., Dawson C., Muchowski J., Perrett L.L., Stubberfield E., Koylass M., Foster G., Davison N.J., Quance C., Sidor I.F., Field C.L., St. Leger J., 2017. Characterisation of North American *Brucella* Isolates from Marine Mammals. Journal Plos One, 12, e0184758.
- Wund S., Méheust E., Dars C., Dabin W., Demaret F., Guichard B., Jauniaux T., Labrut S., Spitz J., Van Canneyt O., Caurant F., 2023. Strengthening the Health Surveillance of Marine Mammals in the Waters of Metropolitan France by Monitoring Strandings. Frontiers in Marine Science, 10, 3389.

#### **Thèse:**

- Jauniaux T., 2002. Causes de mortalité des mammifères marins sur les côtes continentales de la baie Sud de la Mer du Nord. Thèse de doctorat en sciences vétérinaire, Faculté de Vétérinaire (service de pathologie générale), Université de Liège (Belgique). 191 p.

#### **TFE :**

- Balin A., 2016. La brucellose chez les mammifères marins échoués sur les côtes françaises de la Manche de 1995 à nos jours : enquête épidémiologique et anatomo-pathologique. Université de Toulouse, France.
- De Trez M., 2023. Transmission potentielle de *Brucella* sp. par les parasites respiratoires chez le marsouin commun. Université de Liège, Belgique.
- Jouffroy K., 2020. Incidence de *Brucella* spp. chez les mammifères marins échoués sur les côtes belge et française. Université de Liège, Belgique.
- Laurent E.,
- Polaert R., 2021. Typologie des échouages, causes de mortalité des cétacés et étude sur *Brucella* spp. dans le Nord de la France de 1995 à 2020. Université de Liège, Belgique.
- Zouzou I., 2023. Typologie des échouages, causes de mortalité des pinnipèdes de 1995 à 2021 et étude sur *Brucella* spp. et Influenza en Belgique et au Nord de la France entre 2016 et 2023. Université de Liège, Belgique.

#### **Site internet :**

- RNE, Observatoire Pelagis. Histogrammes et cartes échouage. France. <http://pelagis.in2p3.fr/public/histo-carto/index.php>
- Observatoire Pelagis. Les causes des échouages. France. <https://www.observatoire-pelagis.cnrs.fr/echouages/les-causes/>

## ANNEXES

**Annexe 1 :** Liste reprenant les caractéristiques générales de tous les individus autopsiés durant le stage (février – fin mai) à l’Université de Liège. Les individus A24/5023 et A24/5024 ont été autopsiés à Saint-Martin-Boulogne et le petit rorqual A24/5024, à l’Université de Gand.

\*\*=individus parasités au niveau des voies respiratoires ET dont l’état brucellique est positif (= individus pertinents pour l’étude).

| Individu       | Espèce  | Âge              | Cc | Cause de la mort   |
|----------------|---|------------------|----|--|
| A24/5008       | <i>P. phocoena</i>                                    | Mâle juvénile    | 2  | Emaciation   |
| A24/5009       | <i>P. vitulina</i>                                    | Mâle juvénile    | 2  | Pleurésie hémorragique et purulente (perforation œsophage) |
| A24/5010       | <i>P. vitulina</i>                                    | Mâle juvénile    | 3  | Trauma (fracture crâne)                                    |
| A24/5011       | <i>H. grypus</i>                                      | Femelle adulte   | 1  | Cachexie   |
| A24/5012       | <i>P. phocoena</i>                                    | Femelle juvénile | 2  | Origine infectieuse + émaciation                           |
| A24/5013       | <i>P. vitulina</i>                                    | Femelle adulte   | 2  | Asphyxie (pris dans filet)                                 |
| A24/5014<br>** | <i>P. vitulina</i>                                    | Femelle juvénile | 2  | Pneumonie aiguë séro-hémorragique                          |
| A24/5015       | <i>D. delphis</i>                                     | Mâle adulte      | 2  | Asphyxie (pris dans filet)                                 |
| A24/5016       | <i>D. delphis</i>                                     | Mâle adulte      | 2  | ?  |
| A24/5017       | <i>D. delphis</i>                                     | Mâle adulte      | 2  | Asphyxie (pris dans filet)                                 |
| A24/5018       | <i>P. vitulina</i> (ou <i>H. grypus</i> ) → hybride ? | Mâle juvénile    | 2  | Capture accidentelle                                       |
| A24/5019       | <i>H. grypus</i>                                      | Mâle juvénile    | 3  | Emaciation   |
| A24/5020       | <i>P. vitulina</i>                                    | Femelle juvénile | 2  | Trauma   |
| A24/5021<br>** | <i>P. vitulina</i>                                    | Mâle juvénile    | 2  | Origine infectieuse  |
| A24/5022       | <i>P. vitulina</i>                                    | Femelle juvénile | 2  | Emaciation   |
| A24/5023       | <i>H. grypus</i>                                      | Mâle adulte      | 2  | ?  |
| A24/5024       | <i>H. grypus</i>                                      | Femelle juvénile |    | Trauma   |
| A24/5025       | <i>B. acutorostrata</i>                               | Mâle juvénile    | 2  | Emaciation + syndrome hémorragique                         |
| A24/5026       | <i>P. phocoena</i>                                    | Femelle juvénile | 2  | Emaciation   |
| A24/5027       | <i>P. phocoena</i>                                    | Mâle adulte      | 2  | Trauma (hélices bateau ou turbines)                        |
| A24/5028       | <i>H. grypus</i>                                      | Mâle juvénile    | 2  | Emaciation + trauma au niveau du cou                       |

**Annexe 2 :** Liste reprenant, dans l'ordre chronologique et depuis 2005, tous les mammifères marins positifs à *Brucella* testés à l'Université de Liège. Ce répertoire synthétise l'ensemble des individus mentionnés dans différents travaux de fin d'études, chacun supervisé par T. Jauniaux. (P = poumon ; GglPré = ganglion pré-scapulaire ; GglB = ganglion bronchique ; GglPul = ganglion pulmonaire ; GglH = ganglion hépatique ; GglM = ganglion mésentérique ; R = rate ; GIM = glande mammaire ; E = encéphale ; F = foie ; T = testicule ; V = ventricule ; TG = tractus génital).

\*= individus *Brucella*-positifs étant parasités par des nématodes pulmonaires.

|           | Référence individu | Espèce             | Pool d'organes et/ou organes « dépoolés » positifs | Méthode d'identification | Réalisateur            |
|-----------|--------------------|--------------------|--|--------------------------|------------------------|
| Cétacés   | A06/1271           | <i>P. phocoena</i> | R  | qPCR                     | E. Laurent             |
|           | A08/1510*          | <i>P. phocoena</i> | P/GglB   | Culture                  | E. Laurent             |
|           | A08/1721*          | <i>P. phocoena</i> | R  | qPCR                     | E. Laurent             |
|           | A08/1936*          | <i>P. phocoena</i> | P/TG/R/GIM   | IHC                      | T. Jauniaux            |
|           | A09/1438*          | <i>P. phocoena</i> | Pool (P/GglB)                                      | qPCR                     | A. Balin               |
|           |                    |                    | GglPré/GglB/R/GIM/V/E                              | IHC                      | A. Balin               |
|           | A09/1943           | <i>P. phocoena</i> | GglPré/GglM  | qPCR                     | E. Laurent et A. Balin |
|           |                    |                    | GglPré/GglM/E                                      | Culture                  | E. Laurent             |
|           |                    |                    | P/GglPul/GglPré/R                                  | IHC                      | A. Balin               |
|           | A10/1277*          | <i>P. phocoena</i> | Epididyme  | qPCR                     | E. Laurent             |
|           |                    |                    | Epididyme  | Culture                  | E. Laurent             |
|           | A10/1278*          | <i>P. phocoena</i> | P  | Culture                  | E. Laurent             |
|           | A10/1279*          | <i>P. phocoena</i> | P/GglB   | qPCR                     | A. Balin               |
|           |                    |                    | P/GglB   | Culture                  | E. Laurent             |
|           | A13/1034           | <i>D. delphis</i>  | Pool (P/GglPul)                                    | qPCR                     | A. Balin               |
|           |                    |                    | R/E  | IHC                      | A. Balin               |
|           | A13/1935*          | <i>P. phocoena</i> | P/GglPré/GglB                                      | qPCR                     | A. Balin               |
|           | A17/440            | <i>P. phocoena</i> | Rein   | qPCR                     | K. Jouffroy            |
|           | A20/5010*          | <i>P. phocoena</i> | Pool (P/GglPré)                                    | qPCR                     | R. Polaert             |
| A20/5076* | <i>D. delphis</i>  | Pool (P/GglPré)    | qPCR   | R. Polaert               |                        |
|           |                    | P                  | IHC  | R. Polaert               |                        |

|           |                    |                    |  |           |                        |
|-----------|--------------------|--------------------|--|-----------|------------------------|
|           | A21/5063*          | <i>P. phocoena</i> | Pool (P/GglPré)                                | qPCR      | R. Polaert             |
|           |                    |                    | P  | IHC       | R. Polaert             |
|           |                    |                    | Larves de nématodes pulmonaires (Pseudaliidae) | qPCR      | M. De Trez             |
| Phoques   | A05/899            | <i>P. vitulina</i> | R  | qPCR      | E. Laurent             |
|           | A10/941            | <i>P. vitulina</i> | GglPré   | Culture   | E. Laurent             |
|           |                    |                    | P/GglPré/GglB/R/T/Larves (cfr RAPPORT)         | IHC       | M. Didier / R. Polaert |
|           | A10/1138           | <i>H. grypus</i>   | GglH   | qPCR      | E. Laurent             |
|           |                    |                    | GglPré/R/GglH                                  | Culture   | E. Laurent             |
|           |                    |                    | GglPré/R/GglH/F/E/T                            | IHC       | M. Didier / R. Polaert |
|           | A12/1999*          | <i>H. grypus</i>   | P  | qPCR      | A. Balin               |
|           | A13/316            | <i>P. vitulina</i> | Pool (P/GglPul)                                | qPCR      | A. Balin               |
|           |                    |                    | GglPré/T/E                                     | IHC       | A. Balin               |
|           | A13/329            | <i>P. vitulina</i> | -non mentionné-                                | IHC       | A. Balin               |
|           | A19/541*           | <i>P. vitulina</i> | Pool (P/R/GglB/Nématodes)                      | qPCR      | K. Jouffroy            |
|           | A20/5002           | <i>P. vitulina</i> | Pool (P/GglPré)                                | qPCR      | R. Polaert             |
|           | A21/5027           | <i>P. vitulina</i> | Pool (P/GglPré)                                | qPCR      | R. Polaert             |
|           |                    |                    | P  | IHC       | R. Polaert             |
|           | A22/5018           | <i>P. vitulina</i> | Pool (P/GglPré/GglB/R/E)                       | qPCR      | I. Zouzou              |
|           | A22/5032           | <i>H. grypus</i>   | Pool (P/GglB/R/E)                              | qPCR      | I. Zouzou              |
| A23/5011* | <i>P. vitulina</i> | Pool (P/GglPré/R)  | qPCR   | I. Zouzou |                        |
| A24/5014* | <i>P. vitulina</i> | P/GglPré/GglB/R/E  | qPCR   | P. Lomba  |                        |
| A24/5021* | <i>P. vitulina</i> | P/GglBPré/GglB/R   | qPCR   | P. Lomba  |                        |

**Annexe 3** : Résultats des tests qPCR pour *Brucella* spp. effectués sur les échantillons de larves provenant des poumons des individus A09/1438, A10/1279, A20/5076, A23/5011 et A24/5014. Contrôle négatif : - ; contrôle positif : + .

| Well            | Colour  | Cq    | Efficiency | Efficiency R <sup>2</sup> | Result                          |
|-----------------|---|-------|------------|---------------------------|---------------------------------|
| -               |   |       |            |                           |                                 |
| 10              |    | -     | -          | -                         | Excluded                        |
| +               |   |       |            |                           | $\bar{x} = 24,07 \sigma = 0,00$ |
| 9               |    | 24,07 | -          | -                         |                                 |
| <b>A09-1438</b> |   |       |            |                           |                                 |
| 13              |    | -     | -          | -                         | Excluded                        |
| 14              |    | -     | -          | -                         | Excluded                        |
| <b>A10-1279</b> |   |       |            |                           |                                 |
| 11              |    | -     | -          | -                         | Excluded                        |
| 12              |    | -     | -          | -                         | Excluded                        |
| A20-5076        |   |       |            |                           | $\bar{x} = 34,64 \sigma = 0,46$ |
| 19              |    | 34,18 | -          | -                         |                                 |
| 20              |   | 35,10 | -          | -                         |                                 |
| <b>A23-5011</b> |   |       |            |                           |                                 |
| 17              |  | -     | -          | -                         | Excluded                        |
| 18              |  | -     | -          | -                         | Excluded                        |
| A24-5014        |   |       |            |                           | $\bar{x} = 35,55 \sigma = 0,30$ |
| 15              |  | 35,26 | -          | -                         |                                 |
| 16              |  | 35,85 | -          | -                         |                                 |

**Annexe 4** : Résultats des tests qPCR pour *Brucella* spp. effectués sur les échantillons de larves provenant des poumons de l'individu A13/1935. Contrôle négatif : - ; contrôle positif : + .

| Well     | Colour  | Cq    | Efficiency | Efficiency R <sup>2</sup> | Result                          |
|----------|---|-------|------------|---------------------------|---------------------------------|
| -        |   |       |            |                           |                                 |
| 3        |  | -     | -          | -                         | Excluded                        |
| +        |   |       |            |                           | $\bar{x} = 22,69 \sigma = 0,00$ |
| 2        |  | 22,69 | 0,84       | 0,99853                   |                                 |
| A13-1935 |   |       |            |                           | $\bar{x} = 37,60 \sigma = 0,23$ |
| 4        |  | 37,84 | 0,56       | 0,99127                   |                                 |
| 5        |  | 37,37 | 0,91       | 0,99986                   |                                 |

**Annexe 5** : Résultats des tests qPCR pour *Brucella* spp. effectués sur les échantillons de larves provenant des poumons des individus A24/5021, A24/5024 et A24/5028. Contrôle négatif : - ; contrôle positif : + .

| Well  | Colour | Cq    | Efficiency | Efficiency R <sup>2</sup> | Result   |
|---|--------|-------|------------|---------------------------|----------|
| -   |        |       |            |                           |          |
| 18  |        | -     | -          | -                         | Excluded |
| + <span style="float: right;"><math>\bar{x} = 22,95 \sigma = 0,00</math></span>                   |        |       |            |                           |          |
| 17  |        | 22,95 | 0,88       | 0,99827                   |          |
| <b>A24-5021 ---</b> <span style="float: right;"><math>\bar{x} = 37,54 \sigma = 0,89</math></span> |        |       |            |                           |          |
| 21  |        | 38,43 | 0,83       | 0,99745                   |          |
| 22  |        | 36,65 | 1,02       | 0,99821                   |          |
| <b>A24-5021 +++</b> <span style="float: right;"><math>\bar{x} = 34,64 \sigma = 0,34</math></span> |        |       |            |                           |          |
| 19  |        | 34,30 | 0,81       | 0,99952                   |          |
| 20  |        | 34,98 | 0,72       | 0,99976                   |          |
| <b>A24-5024</b> <span style="float: right;"><math>\bar{x} = 38,22 \sigma = 0,00</math></span>     |        |       |            |                           |          |
| 23  |        | -     | -          | -                         | Excluded |
| 24  |        | 38,22 | 0,91       | 0,99563                   |          |
| <b>A24-5028</b>   |        |       |            |                           |          |
| 25  |        | -     | -          | -                         | Excluded |
| 26  |        | -     | -          | -                         | Excluded |