

CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON

Année 2022 - Thèse n° 117

**ÉTUDE DES LÉSIONS HISTOLOGIQUES SECONDAIRES À L'INFECTION
PAR LE VIRUS USUTU CHEZ LES OISEAUX STRIGIFORMES ET
PASSERIFORMES**

THESE

Présentée à l'Université Claude Bernard Lyon 1
(Médecine – Pharmacie)

Et soutenue publiquement le 2 décembre 2022
Pour obtenir le titre de Docteur Vétérinaire

Par

BOISGONTIER Elodie

CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON

Année 2022 - Thèse n° 117

**ÉTUDE DES LÉSIONS HISTOLOGIQUES SECONDAIRES À L'INFECTION
PAR LE VIRUS USUTU CHEZ LES OISEAUX STRIGIFORMES ET
PASSERIFORMES**

THESE

Présentée à l'Université Claude Bernard Lyon 1
(Médecine – Pharmacie)

Et soutenue publiquement le 2 décembre 2022
Pour obtenir le titre de Docteur Vétérinaire

Par

BOISGONTIER Elodie

Liste des enseignants du Campus Vétérinaire de Lyon (14-09-2022)

Pr	ABITBOL	Marie	Professeur
Dr	ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	Maître de conférences
Pr	ARCANGIOLI	Marie-Anne	Professeur
Dr	AYRAL	Florence	Maître de conférences
Dr	BECKER	Claire	Maître de conférences
Dr	BELLUCO	Sara	Maître de conférences
Dr	BENAMOU-SMITH	Agnès	Maître de conférences
Pr	BENOIT	Etienne	Professeur
Pr	BERNY	Philippe	Professeur
Pr	BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	Professeur
Dr	BOURGOIN	Gilles	Maître de conférences
Dr	BRUTO	Maxime	Maître de conférences
Dr	BRUYERE	Pierre	Maître de conférences
Pr	BUFF	Samuel	Professeur
Pr	BURONFOSSE	Thierry	Professeur
Dr	CACHON	Thibaut	Maître de conférences
Pr	CADORÉ	Jean-Luc	Professeur
Pr	CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	Professeur
Pr	CHABANNE	Luc	Professeur
Pr	CHALVET-MONFRAY	Karine	Professeur
Dr	CHAMEL	Gabriel	Maître de conférences
Dr	CHETOT	Thomas	Maître de conférences
Dr	DE BOYER DES ROCHES	Alice	Maître de conférences
Pr	DELIGNETTE-MULLER	Marie-Laure	Professeur
Pr	DJELOUADJI	Zorée	Professeur
Dr	ESCRIOU	Catherine	Maître de conférences
Dr	FRIKHA	Mohamed-Ridha	Maître de conférences
Dr	GALIA	Wessam	Maître de conférences
Pr	GILOT-FROMONT	Emmanuelle	Professeur
Dr	GONTHIER	Alain	Maître de conférences
Dr	GREZEL	Delphine	Maître de conférences
Dr	HUGONNARD	Marine	Maître de conférences
Dr	JOSSON-SCHRAMME	Anne	Chargé d'enseignement contractuel
Pr	JUNOT	Stéphane	Professeur
Pr	KODJO	Angeli	Professeur
Dr	KRAFFT	Emilie	Maître de conférences
Dr	LAABERKI	Maria-Halima	Maître de conférences
Dr	LAMBERT	Véronique	Maître de conférences
Pr	LE GRAND	Dominique	Professeur
Pr	LEBLOND	Agnès	Professeur
Dr	LEDOUX	Dorothee	Maître de conférences
Dr	LEFEBVRE	Sébastien	Maître de conférences
Dr	LEFRANC-POHL	Anne-Cécile	Maître de conférences
Dr	LEGROS	Vincent	Maître de conférences
Pr	LEPAGE	Olivier	Professeur
Pr	LOUZIER	Vanessa	Professeur
Dr	LURIER	Thibaut	Maître de conférences
Dr	MAGNIN	Mathieu	Maître de conférences
Pr	MARCHAL	Thierry	Professeur
Dr	MOSCA	Marion	Maître de conférences
Pr	MOUNIER	Luc	Professeur
Dr	PEROZ	Carole	Maître de conférences
Pr	PIN	Didier	Professeur
Pr	PONCE	Frédérique	Professeur
Pr	PORTIER	Karine	Professeur
Dr	POUZOT-NEVORET	Céline	Maître de conférences

Pr	PROUILLAC	Caroline	Professeur
Pr	REMY	Denise	Professeur
Dr	RENE MARTELLET	Magalie	Maître de conférences
Pr	ROGER	Thierry	Professeur
Dr	SAWAYA	Serge	Maître de conférences
Pr	SCHRAMME	Michael	Professeur
Pr	SERGENTET	Delphine	Professeur
Dr	TORTEREAU	Antonin	Maître de conférences
Dr	VICTONI	Tatiana	Maître de conférences
Pr	VIGUIER	Eric	Professeur
Dr	VIRIEUX-WATRELOT	Dorothée	Chargé d'enseignement contractuel
Pr	ZENNER	Lionel	Professeur

Remerciements aux membres du jury

À Monsieur le Professeur François Mion,

De l'Université Claude Bernard Lyon 1 et de la Faculté de Médecine,
Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury,
Tous mes hommages les plus respectueux.

À Monsieur le Docteur Antonin Tortereau,

De VetAgro Sup, Campus vétérinaire de Lyon,
Pour avoir accepté ce sujet et pour m'avoir soutenue lors de la rédaction du manuscrit,
Tous mes remerciements les plus sincères.

À Monsieur le Docteur Pierre Bruyère,

De VetAgro Sup, Campus vétérinaire de Lyon,
Pour avoir accepté de juger ce manuscrit et de siéger à ce jury,
Je vous remercie sincèrement.

À Madame le Docteur Karin Lemberger,

Du laboratoire d'analyses VetDiagnostics de Charbonnières les bains,
Qui m'a accompagnée et guidée tout au long de ce travail,
Pour ta patience, ta bienveillance et ton aide précieuse, sans lesquelles ce travail n'aurait
jamais vu le jour,
Mille merci.

Table des matières

Table des annexes	15
Table des figures	17
Table des tableaux	19
Liste des abréviations	21
Introduction	23
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	25
I/ Présentation du virus Usutu et de son épidémiologie	25
A. Caractéristiques du virus	25
1) Phylogénie	25
2) Structure	26
3) Souches et lignées	27
B. Epidémiologie	28
1) Répartition	29
a. Origine.....	29
b. Historique : émergence en Europe de l'Ouest.....	29
c. Répartition actuelle et tendance en France.....	31
2) Cycle vectoriel	33
a. Etude des vecteurs.....	33
b. Modalités d'infection	34
c. Cycle d'infection	35
3) Spectre d'hôtes	36
a. Hôtes primaires.....	36
b. Hôtes accidentels.....	37
c. Zoonose rare	38
C. Symptômes associés	39
1) Troubles généraux.....	39
2) Troubles neurologiques.....	39
II/ Les lésions engendrées par le virus Usutu	40
A. Particularités de l'histologie des oiseaux	40
1) Caractéristiques macroscopiques et histologiques de chaque organe	41

a.	Structures vasculaires	41
b.	Histologie cérébrale.....	41
c.	Histologie splénique	42
d.	Histologie hépatique	43
e.	Histologie pulmonaire.....	44
f.	Histologie cardiaque.....	44
g.	Histologie rénale.....	45
2)	Aspect histologique de l'inflammation	46
B.	Pathogénie.....	47
1)	Transport depuis le site d'infection	47
2)	Entrée dans la cellule.....	47
3)	Réplication du virus.....	48
4)	Particularités de la pathogénie dans le cerveau.....	49
5)	Réponse immunitaire de l'hôte	50
C.	Etude des lésions provoquées par USUV	51
1)	Lésions microscopiques consécutives à l'infection par le virus USUV.....	51
a.	Description des principales lésions	51
b.	Particularités des lésions cérébrales.....	53
2)	Lésions macroscopiques consécutives à l'infection par le virus Usutu	54
	PARTIE EXPERIMENTALE	57
I/	Contexte et objectifs de l'étude	57
A.	Le projet Usutu	57
B.	Les hypothèses à vérifier.....	58
1)	Pattern lésionnel et le tropisme d'organe	58
2)	Recherche de facteurs influençant le tropisme d'organe et les symptômes..	58
3)	Mise en relation des lésions observées et de la présence du virus.....	59
II/	Matériel et méthode	59
A.	La collecte des données.....	59
1)	Le plan d'échantillonnage.....	59
a.	Origine des prélèvements	59
b.	Organes étudiés	60
c.	Conservation et transport.....	61

2) Analyses virologiques	62
1) Les archives VetDiagnostics	62
2) Les documents d'accompagnement des prélèvements	63
a. Les rapports d'autopsie	63
b. Le questionnaire	63
B. Traitement des données	64
1) Recueil des rapports d'autopsie et des questionnaires	64
2) Préparation des lames histologiques et lecture	64
a. Réalisation des blocs de paraffine	64
b. Réalisation des lames histologiques	65
c. Lecture des lames	65
3) Traitement des résultats des analyses virologiques	66
4) Réalisation des immunomarquages	66
a. Les critères de sélection des cas	66
b. Les marqueurs	66
c. Les témoins	67
d. Le protocole	68
C. Analyse et interprétation des données	68
1) Analyse des observations histologiques	68
a. Inventaire des lésions	68
b. Confrontation des lésions histologiques microscopiques aux lésions macroscopiques d'autopsie	69
c. Identification des lésions utiles pour le diagnostic d'USUV	69
d. Détermination des organes d'intérêt	69
e. Etude histologique des cas non testés en RT-PCR USUV	69
2) Evaluation des facteurs de risque	70
3) Analyse des résultats d'immunomarquage	70
III/ Résultats	71
A. Résultats de l'étude des rapports d'autopsie	72
1) Anamnèse	72
a. Sexe	72
b. Age	72

2) Symptômes ante-mortem.....	72
3) Lésions macroscopiques.....	73
B. Résultats de l'étude des prélèvements histologiques.....	74
1) Lésions histologiques spléniques	74
2) Lésions histologiques hépatiques	75
3) Lésions histologiques cérébrales.....	76
4) Lésions histologiques pulmonaires	77
5) Lésions histologiques cardiaques.....	78
6) Lésions histologiques rénales	79
C. Résultats virologiques	80
D. Résultats de l'immunohistochimie	81
E. Analyse des résultats.....	82
1) Les patterns lésionnels et le tropisme d'organe.....	82
a. Mise en relation des lésions histologiques et macroscopiques.....	82
b. Sélection des lésions d'intérêt dans le diagnostic d'USUV	83
c. Sélection des cas intéressants pour l'étude	84
d. Détermination des organes d'intérêt dans le diagnostic d'USUV.....	85
e. Etablissement des différents profils lésionnels.....	86
2) Etude des cas anciens non testés par analyse virologique	86
3) Etude des facteurs pouvant influencer le tropisme d'organe	88
a. Facteur « sexe »	88
b. Facteur « âge ».....	89
c. Facteur « espèce »	89
d. Facteur « souche virale »	90
4) Analyse et interprétation des résultats de l'immunohistochimie.....	90
a. Analyse statistique et interprétation des résultats d'immunohistochimie.....	90
IV/ Discussion	91
A. Interprétation des résultats et comparaison avec la littérature	91
1) Les lésions histologiques	91
a. Confrontation des résultats histologiques et macroscopiques	91
b. Les lésions histologiques observées	92
c. Le tropisme d'organe	92

d. Facteurs influençant le tropisme d'organe.....	93
2) Les immunomarquages	94
B. Biais et limites de l'étude.....	95
1) Les effectifs	95
2) La fiabilité des résultats.....	95
3) Critiques et biais des protocoles d'analyse	96
a. Le plan d'échantillonnage	96
b. Le scoring histologique	96
c. L'immunohistochimie.....	96
C. Perspectives et questions soulevées par l'étude.....	97
CONCLUSION.....	99
BIBLIOGRAPHIE.....	101
ANNEXES.....	111

Table des annexes

Annexe 1 : Liste des parcs zoologiques participant au projet Usutu et répartition des prélèvements reçus	111
Annexe 2 : Origine des prélèvements hors parcs zoologiques	111
Annexe 3 : Questionnaire d'accompagnement des prélèvements	112
Annexe 4 : Liste des cas sélectionnés pour les immunomarquages	114
Annexe 5 : Protocole d'immunomarquage du virus Usutu	115
Annexe 6 : Détail pour chaque cas positif en RT-PCR USUV, des prélèvements d'organes soumis à l'analyse histologique.....	117
Annexe 7 : Détail pour chaque cas non testé en RT-PCR USUV, des prélèvements d'organes soumis à l'analyse histologique	117
Annexe 8 : Tableau récapitulatif des lésions histologiques retrouvées par organe chez les cas positifs en RT-PCR USUV.....	118
Annexe 9 : Tableau récapitulatif des lésions histologiques retrouvées par organe chez les cas non testés en RT-PCR USUV	119
Annexe 10 : Score lésionnel par cas positif en RT-PCR USUV, selon l'organe.....	119
Annexe 11 : Tropisme d'organe des cas positifs à USUV en RT-PCR selon le sexe, l'âge et l'espèce	120
Annexe 12 : Tableau récapitulatif des tropismes d'organe selon l'espèce, l'âge et le sexe de chaque cas	121

Table des figures

Figure 1 : Arbre phylogénique des flavivirus construit par méthode phénétique	25
Figure 2 : Structure du virion d'USUV (A) et de son ARN (B)	26
Figure 3 : Arbre phylogénétique des différentes souches du virus Usutu construit à partir du gène NS5	28
Figure 4 : Propagation spatio-temporelle probable des différentes lignées d'USUV en Afrique et en Europe	29
Figure 5 : Carte de la répartition de l'USUV en Europe en 2018	30
Figure 6 : Carte de la répartition géographique des isollements des différentes souches d'USUV en France de 2015 à 2018	31
Figure 7 : Carte des départements français concernés par un isolement d'USUV en 2018	32
Figure 8 : <i>Culex pipiens</i>	33
Figure 9 : Illustration du cycle de WNV dans son vecteur	34
Figure 10 : Schéma du cycle de l'infection par le virus Usutu et des périodes d'activité du virus	35
Figure 11 : Merle noir (<i>Turdus merula</i>)	37
Figure 12 : Chouette lapone (<i>Strix nebulosa</i>).....	37
Figure 13 : Merle noir (<i>Turdus merula</i>) prostré porteur du virus Usutu	39
Figure 14 : Atteinte neurologique chez une chouette lapone (<i>Strix nebulosa</i>)	40
Figure 15 : Perte d'équilibre chez un merle noir (<i>Turdus merula</i>) infecté par USUSV	40
Figure 16 : Schéma de la structure du cerveau du merle noir (<i>Turdus merula</i>).....	41
Figure 17 : Structure histologique du parenchyme de l'encéphale d'un merle noir	41
Figure 18 : Aspect histologique normal (HE) du cervelet de la poule (<i>Gallus domesticus</i>)..	42
Figure 19 : Aspect histologique (HE X400) d'une rate de poule (<i>Gallus domesticus</i>)	42
Figure 20 : Coupe transversale de rate (HE X100) chez un pigeon (<i>Columba livia</i>).....	42
Figure 21 : Aspect histologique (HE X250) du foie d'un pigeon (<i>Columba livia</i>).....	43
Figure 22 : Aspect histologique (HE X400) du foie d'une chouette lapone (<i>Strix nebulosa</i>)	43
Figure 23 : Aspect histologique du parenchyme pulmonaire (HE X400) (A) et des parabronches (HE X100) (B) d'une poule (<i>Gallus domesticus</i>).....	44
Figure 24 : Aspect histologique du myocarde (HE X100) d'une autruche (<i>Struthio camelus</i>).....	44
Figure 25 : Granulopoïèse extramédullaire dans le myocarde d'une poule (<i>Gallus domesticus</i>) de 6 mois	45
Figure 26 : Aspect histologique (HE X250) de la corticale d'un rein de chouette lapone (<i>Strix nebulosa</i>).....	45
Figure 27 : Frottis sanguin d'un oiseau en coloration Wright-Giemsa	46
Figure 28 : Péricardite à <i>Escherichia coli</i> chez une poule (<i>Gallus domesticus</i>)	46
Figure 29 : Schéma d'une unité neurovasculaire.....	49
Figure 30 : Schéma de l'action de l'immunité au cours d'une infection par USUV dans le cerveau.....	51
Figure 31 : Nécrose fibrinoïde hépatique chez des souris (<i>Mus musculus</i>) inoculées avec USUV)	52
Figure 32 : Foyer de nécrose neuronale chez un merle noir (<i>Turdus merula</i>) infecté par USUV.....	52

Figure 33 : Nodule microglial dans le cortex cérébral d'un merle noir (<i>Turdus merula</i>) infecté par USUV	53
Figure 34 : Hépatomégalie (A) et splénomégalie (B) chez deux merles noirs (<i>Turdus merula</i>) infectés par USUV.....	54
Figure 35 : Protocole de réalisation des prélèvements	61
Figure 36 : Rapport d'autopsie d'une chouette harfang positive en RT-PCR USUV	63
Figure 37 : Etapes de préparation des blocs de paraffine.....	65
Figure 38 : Principe de l'immunomarquage d'USUV.....	67
Figure 39 : Positionnement des lames sur le Discovery XT	68
Figure 40 : Nécrose fibrinoïde splénique chez une chouette lapone (cas V18-6141)	74
Figure 41 : Nécrose fibrinoïde hépatocytaire chez une chouette lapone	76
Figure 42 : Inflammation mononucléée hépatique chez une chouette lapone	76
Figure 43 : Nodule microglial chez une chouette lapone (cas V18-6141)	77
Figure 44 : Thrombus de fibrine dans un capillaire pulmonaire chez une chouette lapone	78
Figure 45 : Infiltration de cellules mononucléées entre les cardiomyocytes d'une chouette lapone atteint par USUV.....	79
Figure 46 : Neurone marqué positivement en IHC chez une chouette lapone positive en RT-PCR USUV (V17-6504).....	81
Figure 47 : Marquage IHC positif sur la rate (X100) d'une chouette lapone	82
Figure 48 : Marquage IHC hépatique (X250) douteux chez une chouette lapone.....	82
Figure 49 : Représentation graphique de la répartition du nombre de lésions imputables à USUV dans chaque organe en fonction du score lésionnel	85
Figure 50 : Tropisme d'organe selon le sexe de l'hôte	88
Figure 51 : Tropisme d'organe selon la	89
Figure 52 : Tropisme d'organe du virus Usutu selon l'espèce	89

Table des tableaux

Tableau I : Liste des espèces positives en RT-PCR USUV représentées dans l'étude histologique	60
Tableau II : Liste des espèces non testés en RT-PCR USUV représentées dans l'étude histologique	62
Tableau III : Symptômes objectivés en ante-mortem issus des rapports d'autopsie	72
Tableau IV : Lésions macroscopiques obtenues d'après les rapports d'autopsie chez les oiseaux avec une RT-PCR USUV positive	73
Tableau V : Lésions macroscopiques obtenues d'après les rapports d'autopsie chez les oiseaux non testés en RT-PCR USUV	73
Tableau VI : Lésions spléniques des oiseaux positifs en RT-PCR USUV et non testés.....	74
Tableau VII : Lésions hépatiques des oiseaux positifs en RT-PCR USUV et non-testés	75
Tableau VIII : Lésions cérébrales des oiseaux positifs en RT-PCR USUV et non testés.....	76
Tableau IX : Lésions pulmonaires des oiseaux positifs en RT-PCR USUV et non testés.....	77
Tableau X : Lésions cardiaques des oiseaux positifs en RT-PCR USUV et non testés.....	78
Tableau XI : Lésions rénales et systémique des oiseaux positifs en RT-PCR USUV et non testés	79
Tableau XII : Résultats de l'identification des souches virales suite à la RT-PCR-USUV	80
Tableau XIII : Résultats des immunomarquages par organe et par espèce.....	81
Tableau XIV : Tableau de contingence entre les lésions macroscopiques à l'autopsie et microscopiques à l'histologie pour la rate et le foie des cas positifs en RT-PCR USUV	83
Tableau XV : Classement des cas non testés en RT-PCR selon leur susceptibilité d'atteinte par USUV.....	87
Tableau XVI : Table de contingence des immunomarquages et des lésions histologiques .	90

Liste des abréviations

ACVP : Collège américain des pathologistes vétérinaires

AFVPZ : Association Francophone des Vétérinaires en Parcs Zoologiques

ANSES : Agence Nationale de Sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'Environnement et du travail

ARN : Acide ribonucléique

DENV : Virus de la dengue

ENVA : Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

HE (coloration) : Coloration hémalum-éosine

HRP : Peroxydase de raifort (de l'anglais « Horseradish Peroxydase »)

IHC : Immune-histochimie ou immunomarquage

IL : Interleukine

JEV : Virus de l'encéphalite japonaise (« Japanese Encephalitis Virus »)

LNR : Laboratoire national de recherche

MVEV : Virus de l'encéphalite de la vallée de Murray (« Murray Valley Encephalitis Virus »)

NVU : Unité neurovasculaire (de l'anglais « neurovascular unit »)

OFB : Office français de la Biodiversité (anciennement **ONCFS** : Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage)

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

RT-PCR : Réaction de polymérisation en chaîne par transcription inverse

Tnfa : « Tumor necrosis factor alpha »

UMR : Unité mixte de recherche

USUV : Virus Usutu (« Usutu Virus »)

WNV : Virus de la fièvre du Nil Occidental (« West Nile Virus »)

YFV : Virus de la fièvre jaune (« Yellow Fever Virus »)

Introduction

Depuis 1960, l'Europe occidentale voit émerger plusieurs flaviviroses zoonotiques. Les virus responsables de ces maladies, tels que le virus de la fièvre du Nil occidental (West Nile Virus de son nom anglais ou WNV) ou plus récemment celui de la dengue (DENV) (cas autochtones depuis 2010 en France et en Croatie (OMS, 2021)), ont été largement étudiés en raison du danger qu'ils représentent à la fois pour la santé humaine et la santé animale, ainsi que par la progression de leur aire de répartition. Cette émergence est favorisée par la mondialisation qui facilite la migration de pathogènes exotiques (Engel et al., 2016) et par les conditions favorables que le changement climatique tend à fournir à leurs vecteurs (Paz, 2015).

Durant l'été 2018, un épisode de mortalité sans précédent a décimé les populations de merles noirs sauvages de l'est de l'Europe, jusqu'en France. Celui-ci s'est accompagné de nombreux décès caractérisés par une atteinte neurologique chez plusieurs espèces d'oiseaux captifs, en particulier les Strigiformes, telles que les chouettes laponnes. L'atteinte s'est révélée être due à un Flavivirus émergent en Europe depuis le début des années 2000 et encore peu connu : le virus Usutu (USUV). L'extension récente de son aire de répartition, son atteinte fulgurante sur l'avifaune, son potentiel zoonotique et sa proximité phylogénique avec le virus West Nile en font une menace émergente et malgré tout méconnue.

La méconnaissance des vecteurs, de la prévalence du virus en France et la difficulté de détection de l'infection ont amené le projet Usutu à voir le jour. Ce projet a pour vocation de mieux connaître le virus en France, sa prévalence, sa pathogénie ainsi que ses expressions cliniques et histologiques. C'est à ce dernier volet que s'intéresse cette thèse.

Elle a pour objectif de répertorier les lésions d'organes observées, d'objectiver la présence du virus Usutu au sein de ces lésions et de rechercher l'existence de potentiels facteurs de risque pour chaque pattern lésionnel.

Afin de mieux comprendre les enjeux liés à son émergence en France et l'état des connaissances relatives aux infections par ce virus, la première partie de cette thèse est consacrée à l'étude des caractéristiques structurales, épidémiologiques et pathogéniques du virus Usutu. La deuxième partie se concentre sur l'étude rétrospective menée sur les lésions histologiques macroscopiques et microscopiques engendrées par USUV avant 2019, qui permettent, en complément des symptômes et de la sérologie, de diagnostiquer l'infection par USUV.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

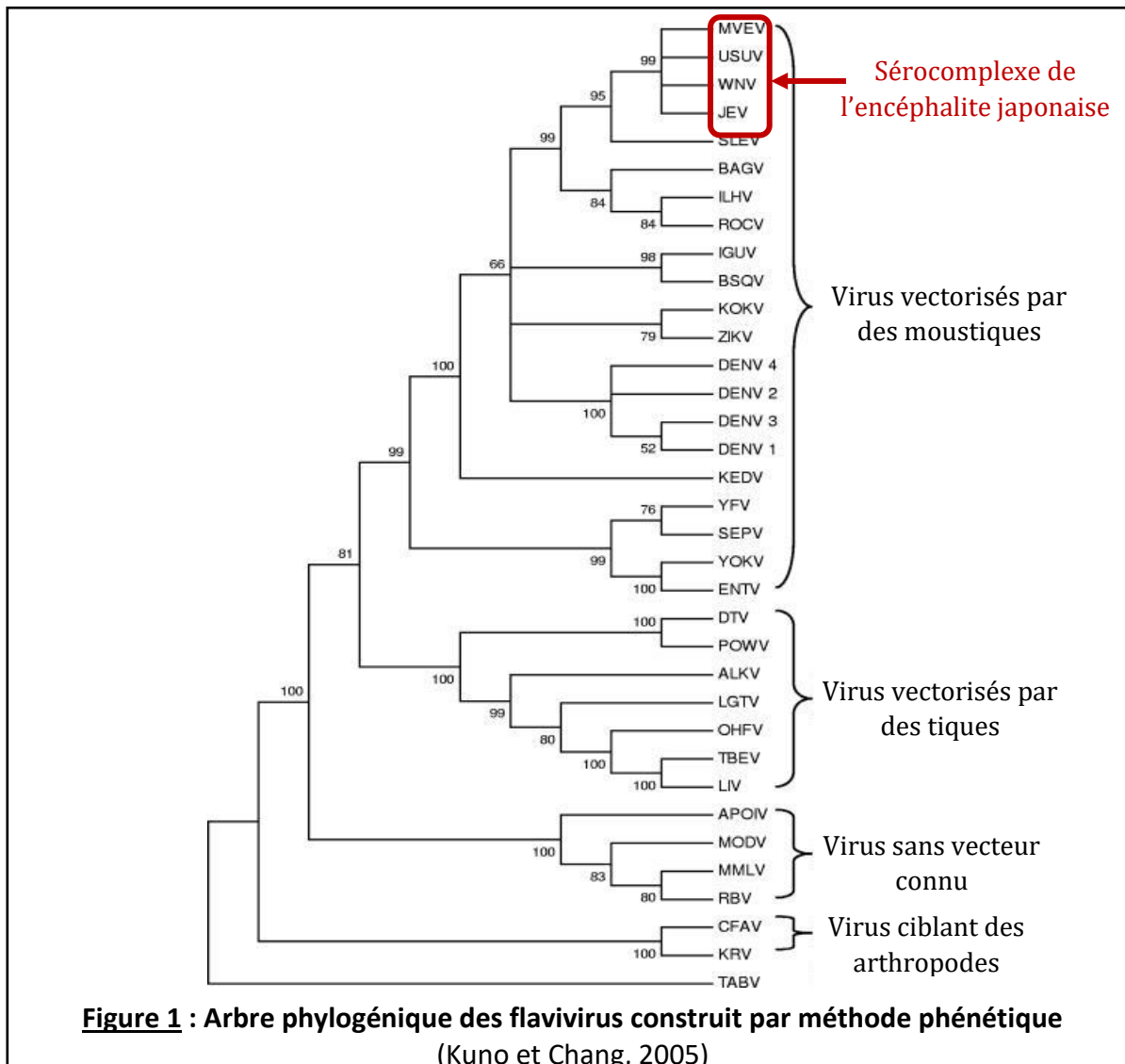
I/ Présentation du virus Usutu et de son épidémiologie

A. Caractéristiques du virus

1) Phylogénie

Le virus Usutu ou USUV selon l'abréviation de son nom anglophone « Usutu virus », est un virus du genre des flavivirus qui appartient à la famille des Flaviviridae (Woodall, 1964).

Les Flaviviridae correspondent à une famille de virus émergents d'intérêt majeur en santé humaine, et qui regroupe notamment le virus de la dengue (DENV), le virus zika ou encore le virus de la fièvre jaune (YFV). Après avoir fait longtemps partie intégrante de la famille des Togaviridae, il faut attendre la publication de Westaway en 1985 (Simpson, 1993) pour que les Flaviviridae occupent une position taxonomique à part entière. Les Flaviviridae sont à présent divisés en deux grands groupes : le groupe monophylétique des maladies vectorisées par les tiques, et celui, polyphylétique, des maladies vectorisées par les moustiques (**figure 1**).



Ce dernier groupe est divisé en de nombreux sérocomplexes, c'est-à-dire des groupes antigéniquement très proches, tel que le sérocomplexe du virus de la fièvre jaune, qui a donné son nom à la famille (*flavus* signifie « jaune » en latin), ou que le sérocomplexe de l'encéphalite japonaise, auquel appartient USUV. Le sérocomplexe de l'encéphalite japonaise porte le nom du virus le plus connu et répandu du complexe (JEV), mais regroupe également d'autres flavivirus, dont le virus de la fièvre du Nil Occidental et celui de l'encéphalite de la vallée de Murray (MVEV), tous deux très proches du virus Usutu (Bakonyi et al., 2004).

Les virus appartenant au complexe de l'encéphalite japonaise présentent en effet de nombreuses similarités pathogéniques et structurales.

2) Structure

A l'instar des autres Flavivirus, USUV est un petit virus enveloppé sphérique, qui mesure de 40 à 60 nm et est constitué de 11,064 nucléotides (Bakonyi et al., 2004). Son volumineux noyau mesure en moyenne 25 à 30 nm de diamètre (Simpson, 1993).

C'est un virus à acide ribonucléique (ARN) simple brin de polarité positive. Composé d'une seule séquence ouverte de lecture (« open reading frame » en anglais), cet ARN comporte 11 gènes. Le génome viral est traduit en une unique polyprotéine, clivée par les protéases cellulaires et virales en trois protéines structurales (C, prM et E) et en huit protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, 2K, NS4B et NS5) (Clé et al., 2019), représentées en **figure 2**. La protéine C, ou protéine de la capsid, constitue la structure interne du virion, et la protéine prM, ou protéine pré-membranaire, contribue à l'assemblage et à la maturation des virions. Les travaux de Smit et collaborateurs (Smit et al., 2011) montrent que la protéine E, ou protéine de l'enveloppe, joue un rôle dans la formation des virions, mais aussi dans de nombreux aspects du cycle viral, notamment l'attachement et la fusion membranaire avec la cellule cible.

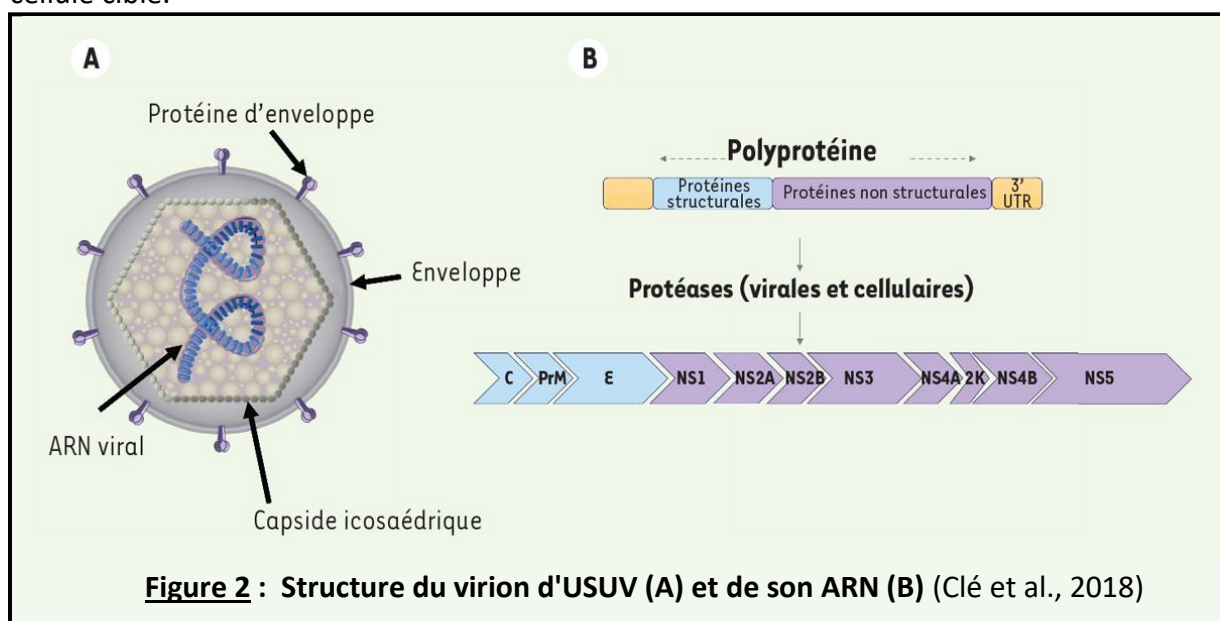


Figure 2 : Structure du virion d'USUV (A) et de son ARN (B) (Clé et al., 2018)

Chez les autres flavivirus, les protéines non structurales forment des complexes de réplication au sein des réticulums endoplasmiques, notamment la protéine NS5, très conservée d'une souche à l'autre (Clé et al., 2019). C'est cette même protéine qui sert de base pour établir la parenté entre les différentes lignées d'USUV.

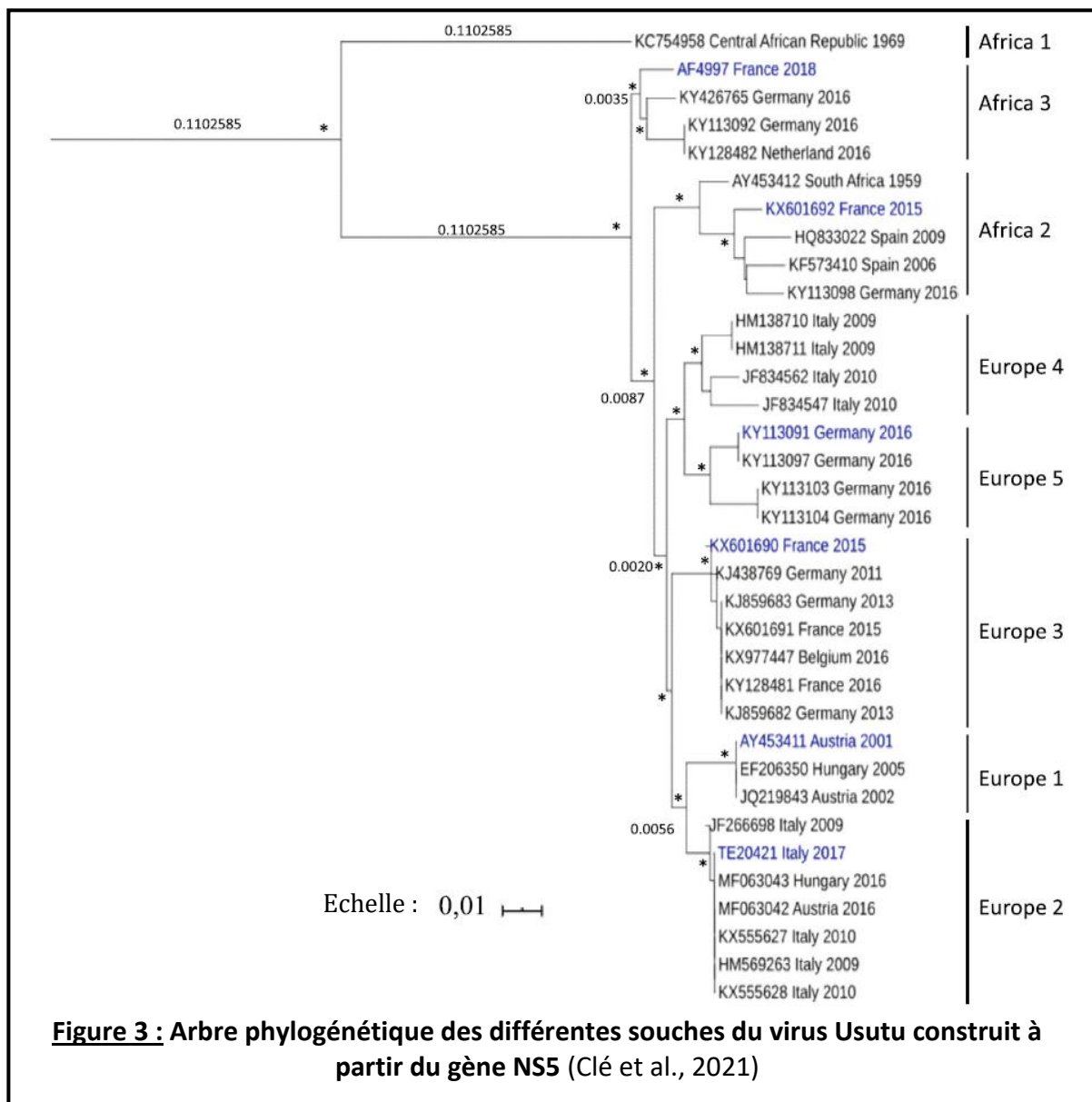
L'ARN du virus Usutu possède également des régions non codantes qui permettent la liaison à des protéines de l'hôte et sont donc nécessaires à la traduction et à la réplication de l'ARN viral. Ces séquences non codantes seraient aussi impliquées dans sa pathogénicité et seraient une origine probable de la capacité du virus à avoir un spectre d'hôte assez large. En effet des mutations de ces régions non codantes ont conduit à une diminution du spectre d'hôte d'USUV (Saiz et Blazquez, 2017).

3) Souches et lignées

Les études phylogéniques menées sur les mutations de la protéine NS5 d'USUV ont permis d'identifier huit lignées de souches d'USUV, séparées en deux grands groupes (**figure 3**) : trois lignées de souches africaines ancestrales (Africa 1, 2 et 3) et cinq de souches européennes (Europe 1 à 5) (Cadar et al., 2017). Ces lignées peuvent circuler de manière simultanée dans une même région. C'est le cas en Europe, où circulent les souches de lignée Af2, Af3, Eu1, Eu2, Eu3 et Eu5. Si historiquement, la lignée Africa 1 est la première à avoir été découverte, elle ne se retrouve pas en Europe.

Même si toutes les souches d'USUV connues sont neurovirulentes et peuvent conduire à la mort de l'hôte primaire, leur pathogénicité, la mortalité qu'elles provoquent et leur taux de réplication varient selon la souche (Clé et al., 2021; Kuchinsky et al., 2020), comme c'est le cas chez le virus West Nile (Gamino et al., 2021).

Par exemple, parmi les souches présentes en Europe, celles de la lignée Europe 2 (Eu2), et notamment la souche Bologna-2009, est décrite comme l'une des plus pathogènes (Clé et al., 2021; Gaibani et al., 2013). Découverte à Bologne en 2009, cette souche a par la suite été isolée en République Tchèque, et présente le plus fort taux d'infection cellulaire, l'infection la plus longue, l'atteinte la plus aiguë (méningo-encéphalite suraiguë) et un très fort taux de mortalité (100% de mortalité par étude in vivo (Clé et al., 2021)). Il semblerait ainsi qu'elle possède un effet cytopathique plus marqué que chez les autres souches. L'effet cytopathique correspond aux changements structurels liés à la présence du virus au sein de son hôte et notamment la lyse cellulaire engendrée par ce dernier. Ceci se traduit à l'histologie par un ensemble de cellules sombres qui se distinguent nettement du fond. Or, Europe 2 est la lignée présentant le plus de mutations, dont une substitution du domaine de la protéine NS5, retrouvée chez WNV, JEV et MVEV, tous trois neuro-invasifs (Gaibani et al., 2013).



B. Epidémiologie

Une **enzootie** correspond au maintien dans le temps d'une maladie dans une certaine région et une certaine population (CNRTL, sans date). Cette maladie peut selon certains facteurs être à l'origine d'une **épizootie**, c'est-à-dire d'une forte augmentation du nombre de cas, limitée dans l'espace (Garcin, 1944).

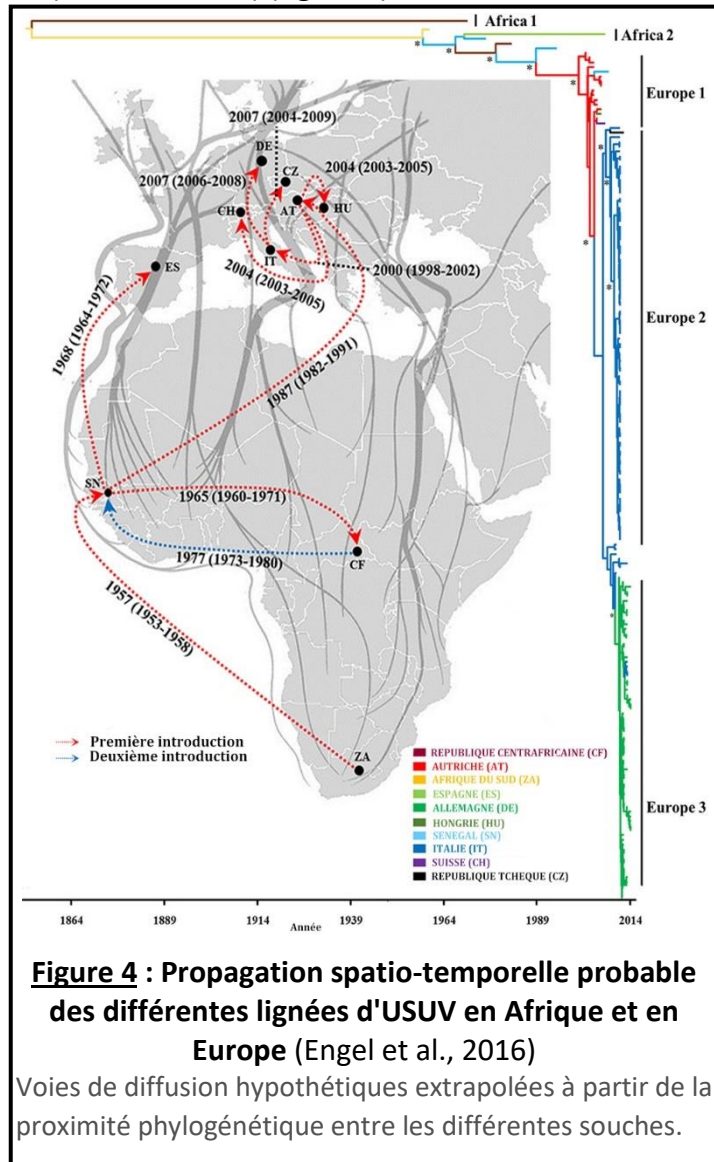
Le virus Usutu se transmet selon un cycle enzootique, avec émergence d'épizooties durant certaines saisons estivales.

1) Répartition

a. Origine

La découverte du virus Usutu remonte à 1959 en Afrique du Sud, à proximité du fleuve Usutu dans le Swaziland, d'où lui vient son nom (Clé et al., 2019) (figure 4).

Il a par la suite été isolé au Nigeria sur des calaos siffleurs (*Bycanistes sharpii*), des bulbuls verdâtres (*Andropapus virens*) et des merles kurrichanes (*Turdus libonyanus*) asymptomatiques, puis dans divers pays Africains : Sénégal, République Centrafricaine, Côte d'ivoire, Kenya, Nigeria, Uganda, Burkina Fasso, ainsi qu'au Maroc et en Tunisie (Clé et al., 2019; Engel et al., 2016; Saiz and Blazquez, 2017). Ces pays correspondent aux pays dans lesquels opéraient des programmes d'épidémiologie, ce qui constitue un biais dans la compréhension de l'historique de la propagation d'USUV, puisque la présence d'USUV n'a été investiguée que dans quelques pays africains. Jusqu'au milieu des années 90, le virus est considéré comme un flavivirus d'intérêt mineur et non dangereux, seulement un seul cas humain ayant été décrit à cette époque (Grottola et al., 2017 ; Vázquez et al., 2011b).



L'arrivée du virus en Europe et la multiplication des cas humains ont progressivement changé cette vision.

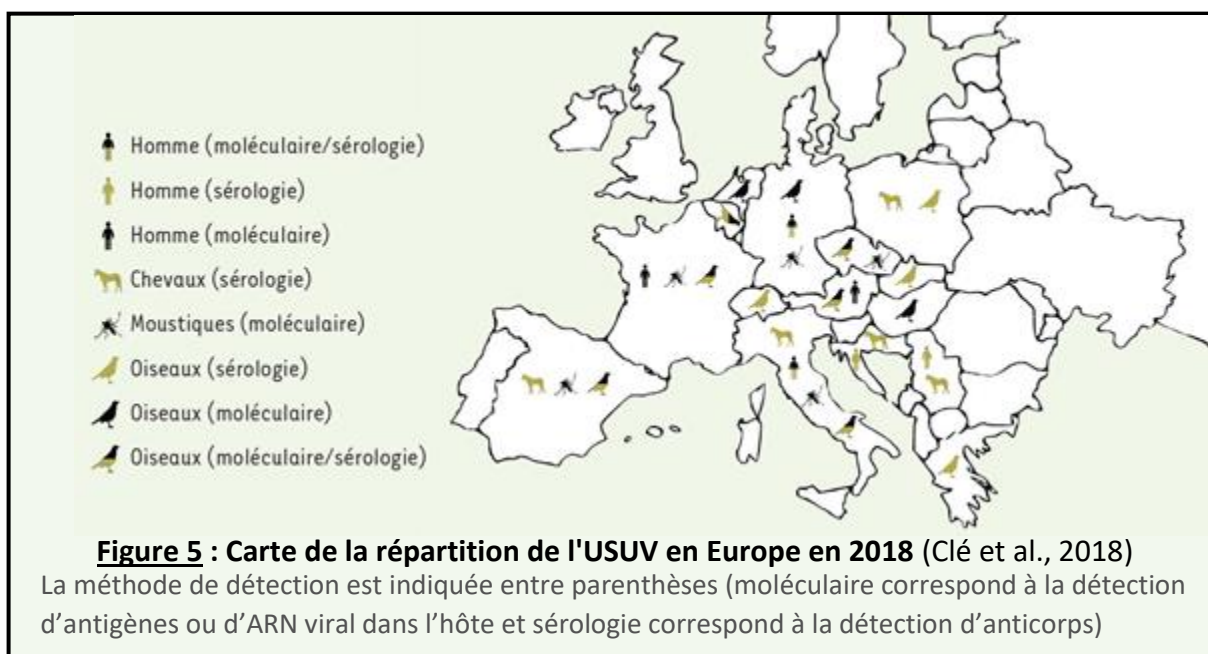
b. Historique : émergence en Europe de l'Ouest

La découverte du virus en Europe a eu lieu en 2001 en Autriche, sur des merles noirs (*Turdus merula*) sauvages morts en masse (Kuchinsky et al., 2020 ; Weissenböck et al., 2003). Mais plusieurs études concordent vers une émergence des premiers cas symptomatiques dès le milieu des années 90 (Calzolari et al., 2017), ce qui a été corroboré par la découverte d'ARN d'USUV dans des échantillons histologiques d'oiseaux italiens issus de Toscane, datant de 1996, au cours d'une étude rétrospective (Weissenböck et al., 2013).

La présence d'anticorps anti-USUV a été détectée chez de petits Strigiformes migrateurs asymptomatiques (notamment le gobe mouche (*Muscicapa striata*), la fauvette (*Sylvia sp.*) et la rousserole (*Acrocephalus scirpaceus*)) remontant d'Afrique du Sud, le long des trois principaux trajets migratoires (Chvala et al., 2004 ; Engel et al., 2016) (représentés sous forme de lignes grises en **figure 4**).

La migration d'espèces hôtes d'Afrique du Sud vers l'Europe serait ainsi la principale voie d'introduction du virus en Europe, même si lors de la détection d'anticorps des réactions croisées peuvent être observées avec le virus West Nile et nécessitent de prendre ces résultats avec prudence (Saiz et Blazquez, 2017). La propagation via les oiseaux migrateurs a déjà été observée chez un autre flavivirus, le virus de l'encéphalite de la vallée de Murray (MVEV) véhiculé depuis l'Australie du Nord vers l'Australie du Sud par des espèces migratrices (Simpson, 1993).

L'étude phylogénique des différentes souches présentes en Europe tend à montrer que le virus aurait été introduit en Europe à l'occasion d'au moins trois événements bien distincts. Le premier épisode d'introduction aurait eu lieu en Espagne en 1950, depuis le Sénégal, avec la lignée Europe 1 (Engel et al., 2016 ; Roesch et al., 2019). Les lignées Europe 2 et Europe 3 auraient par la suite été introduites en Autriche et en Italie respectivement (Roesch et al., 2019), puis se seraient propagées jusqu'en 2015 en Autriche (Weissenböck et al., 2003), en Hongrie (Bakonyi et al., 2007), en Italie (Calzolari et al., 2017 ; Grottole et al., 2017), en Allemagne (Santos et al., 2022) et en Suisse (Engel et al., 2016 ; Kuchinsky et al., 2020). Un total de 12 pays européens étaient alors concernés par des détections d'USUV, avec une mortalité pouvant atteindre jusqu'à 24 % des populations de merles noirs adultes touchées (Ziegler et al., 2015). La répartition du virus en Europe en 2018 est visible en **figure 5**.

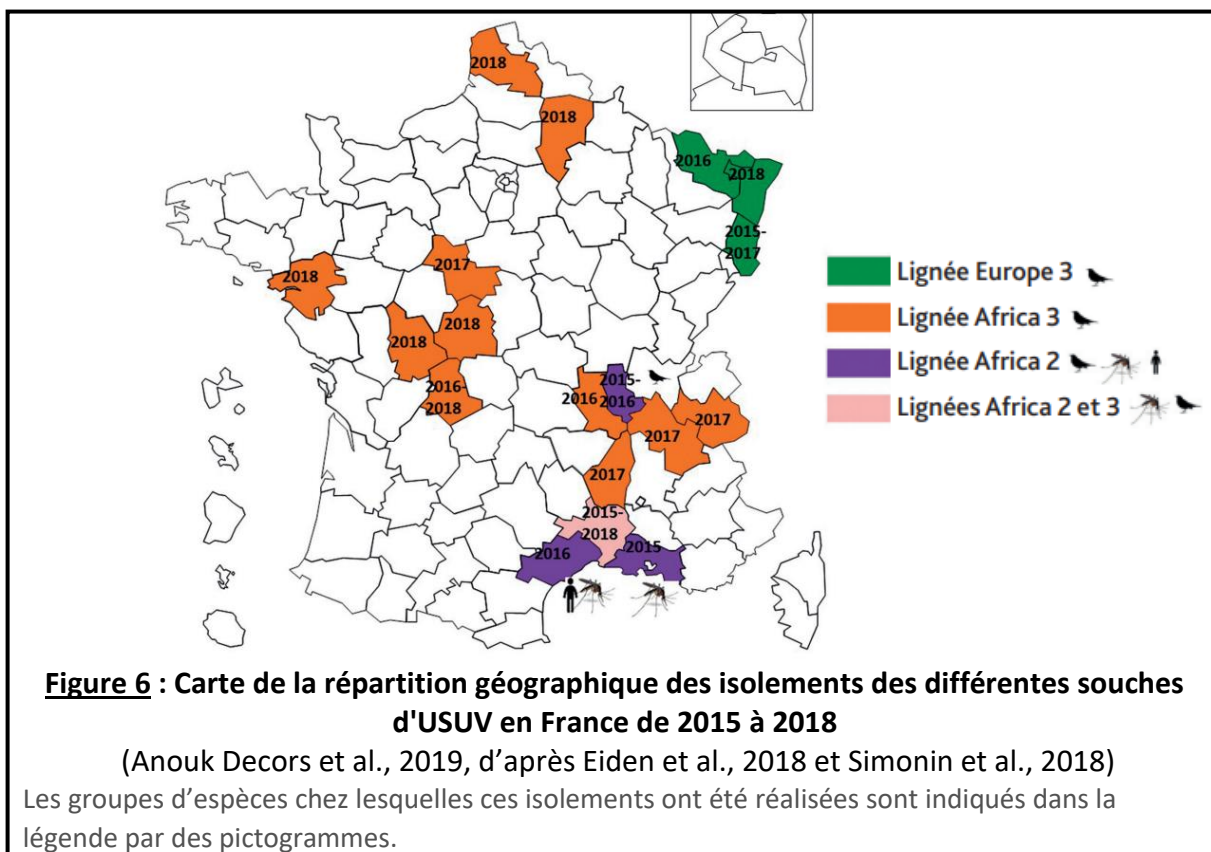


La co-circulation de différentes souches a été observée en Allemagne (Ashraf et al., 2015) et en Italie (Calzolari et al., 2017). Des sérologies positives à USUV chez des espèces répandues

comme le grand corbeau (*Corvus corone*), la pie commune (*Pica pica*), le merle noir (*Turdus merula*) et le moineau domestique (*Passer domesticus*), laissent supposer que ces espèces sont impliquées dans la dispersion et le maintien du virus en Europe, même si des réactions croisées avec le virus West Nile, dont la prévalence en Europe est bien plus élevée que celle d'USUV, ne peuvent être écartées (Saiz et Blazquez, 2017). Le portage asymptomatique par de nombreuses espèces de faune sauvage est en faveur d'une persistance du virus en Europe et donc d'un cycle viral enzootique.

c. Répartition actuelle et tendance en France

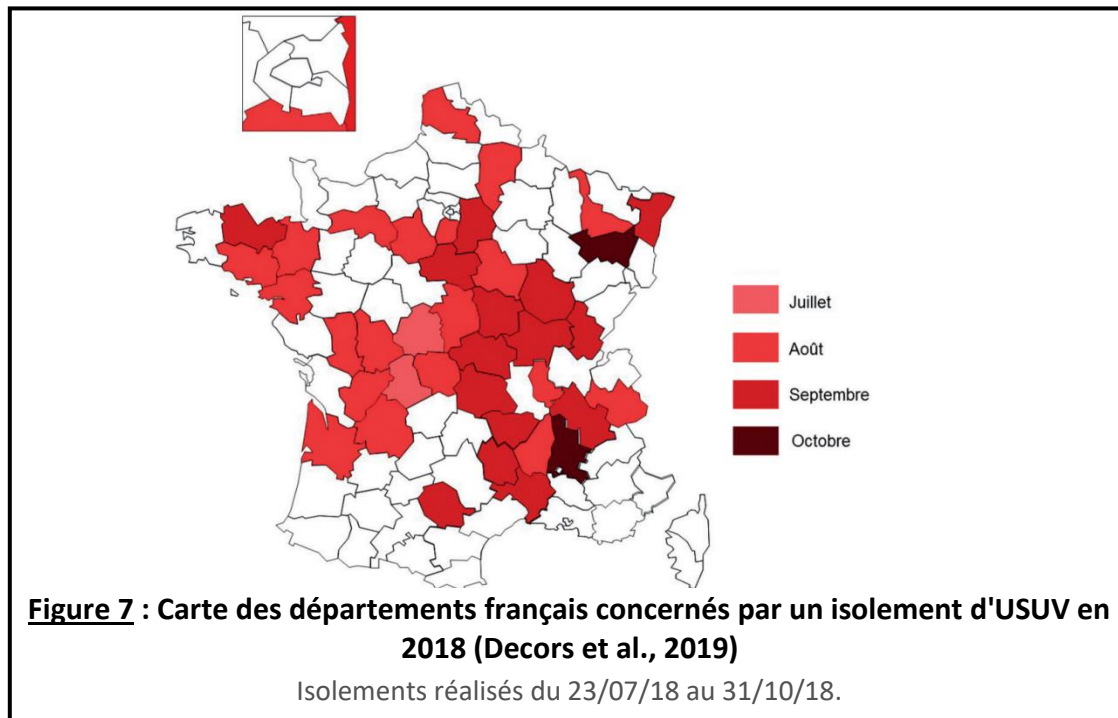
Des suspicions de circulation d'USUV en France sont émises dès 2009, à partir de deux études sérologiques (Vittecoq et al., 2013), mais ce n'est qu'en 2015 que les premiers cas symptomatiques officiels d'USUV y sont découverts pour la première fois, suite à une mortalité accrue de merles noirs (*Turdus merula*) et à la détection d'anticorps anti-USUV chez cinq spécimens dans le Haut-Rhin et le Rhône (Lecollinet et al., 2016). Ces découvertes coïncident avec l'isolement de l'ARN de deux souches d'USUV (Af2 et 3) chez des moustiques *Culex pipiens* en Camargue la même année (Eiden et al., 2018) (**figure 6**).



Jusqu'à présent, trois des lignées d'USUV ont été retrouvées en France (Eu3, Af3 et Af2), correspondant à trois introductions distinctes (**figure 6**). Les principales hypothèses concernant l'origine de ces introductions successives sont une importation directe via les oiseaux migrateurs remontant d'Afrique, ou plus vraisemblablement, au vu des analyses phylogénétiques, une contamination par des oiseaux réservoirs semi-résidents d'Allemagne (Cadar et al., 2017).

Depuis le virus Usutu sévit en France sous forme d'épizooties estivales réparties sur tout le territoire. C'est une des différences par rapport au virus West Nile, dont la propagation reste limitée au bassin Méditerranéen. Leur circulation est fréquemment conjointe dans les régions où ces deux virus sont présents (Santos et al., 2022).

Entre 2015 et 2018, le virus se propage en France, jusqu'à être observé dans 46 départements au cours de l'épizootie de 2018 (Decors et al., 2019) (**figure 7**).



Depuis 2018, les cas d'atteinte par USUV sont anecdotiques en France avec seulement un cas de mortalité de merle noir déclaré en Moselle en juillet 2019 et quatre cas découverts par l'Office français de la biodiversité (OFB, anciennement SAGIR) en 2020.

L'apparition d'une épizootie importante puis de plusieurs années de silence est un phénomène qui a déjà été observé entre 2003 et 2006 en Autriche. Les années 2003 et 2004 ont été témoins d'une forte épizootie, de même que l'année 2018, avec des mortalités massives dans la faune sauvage autrichienne. En 2005 et 2006, les mortalités dues à USUV ont fortement diminué. Deux études sérologiques et statistiques montrent que si la séropositivité était inférieure à 10 % au cours de l'épizootie, les années caractérisées par une faible mortalité étaient corrélées à une forte séropositivité (supérieure à 70 %) de l'avifaune sauvage (Meister et al., 2008 ; Rubel et al., 2008), ce qui suggère qu'une immunité collective protectrice se serait installée pendant plusieurs années. Le phénomène observé de 2018 à 2022 pourrait être similaire.

2) Cycle vectoriel

La propagation rapide du virus Usutu depuis plus de 20 ans en Europe et la saisonnalité de ses atteintes tiennent à son caractère vectoriel. En effet, USUV est un virus vectoriel, c'est-à-dire qu'il est transmis d'un hôte porteur à un individu, appartenant à une espèce sensible à ce virus, par un vecteur biologique.

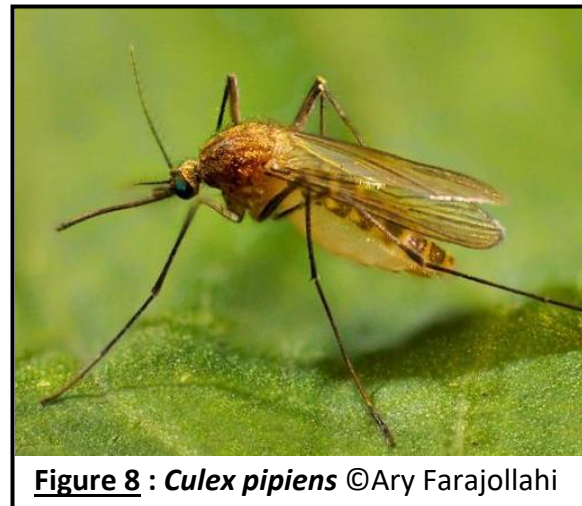
Le virus Usutu est donc à l'origine, à l'instar des autres Flaviviridés, une **arbovirose**. Utilisé pour la première fois en 1942, le terme « arthropod-borne virus » décrit une maladie virale transmise par des arthropodes piqueurs hématophages (moustiques ; tiques ; phlébotomes ...) pouvant affecter un grand nombre d'espèces animales (Kuno et Chang, 2005). Elle nécessite au cours de son cycle de transmission le passage dans le tube digestif d'arthropodes piqueurs pour pouvoir infecter leur hôte définitif chez la plupart des flavivirus (Simpson, 1993 ; Fiacre et al., 2020).

L'identification des espèces vectrices d'USUV et la compréhension de leur cycle de transmission permettent la mise en place de mesures de prévention des infections d'espèces sauvages captives sensibles, ce à quoi s'est intéressée la thèse de Marine Ollivier en 2021 (Ollivier, 2021).

a. Etude des vecteurs

Le premier cas de portage d'USUV a été identifié en 1959 par McIntosh chez un moustique *Culex neavei* en Afrique du Sud, dont le portage comme vecteur a été confirmé expérimentalement (Clé et al., 2019). Cette espèce est aujourd'hui considérée comme le principal vecteur d'USUV en Afrique (Gaibani et Rossini, 2017).

En Europe, USUV n'a été retrouvé que chez des Culicidés et plus particulièrement chez des moustiques des genres *Culex* et *Aedes*. Des prélèvements réalisés en Catalogne, ainsi que dans diverses régions italiennes prouvent que le genre *Culex* est le principal responsable de la vectorisation d'USUV en Europe (Clé et al., 2019). Plus particulièrement, *Culex pipiens* (**figure 8**) est considéré comme le principal vecteur d'USUV en Europe (Clé et al., 2019 ; Jöst et al., 2011 ; M et al., 2010).



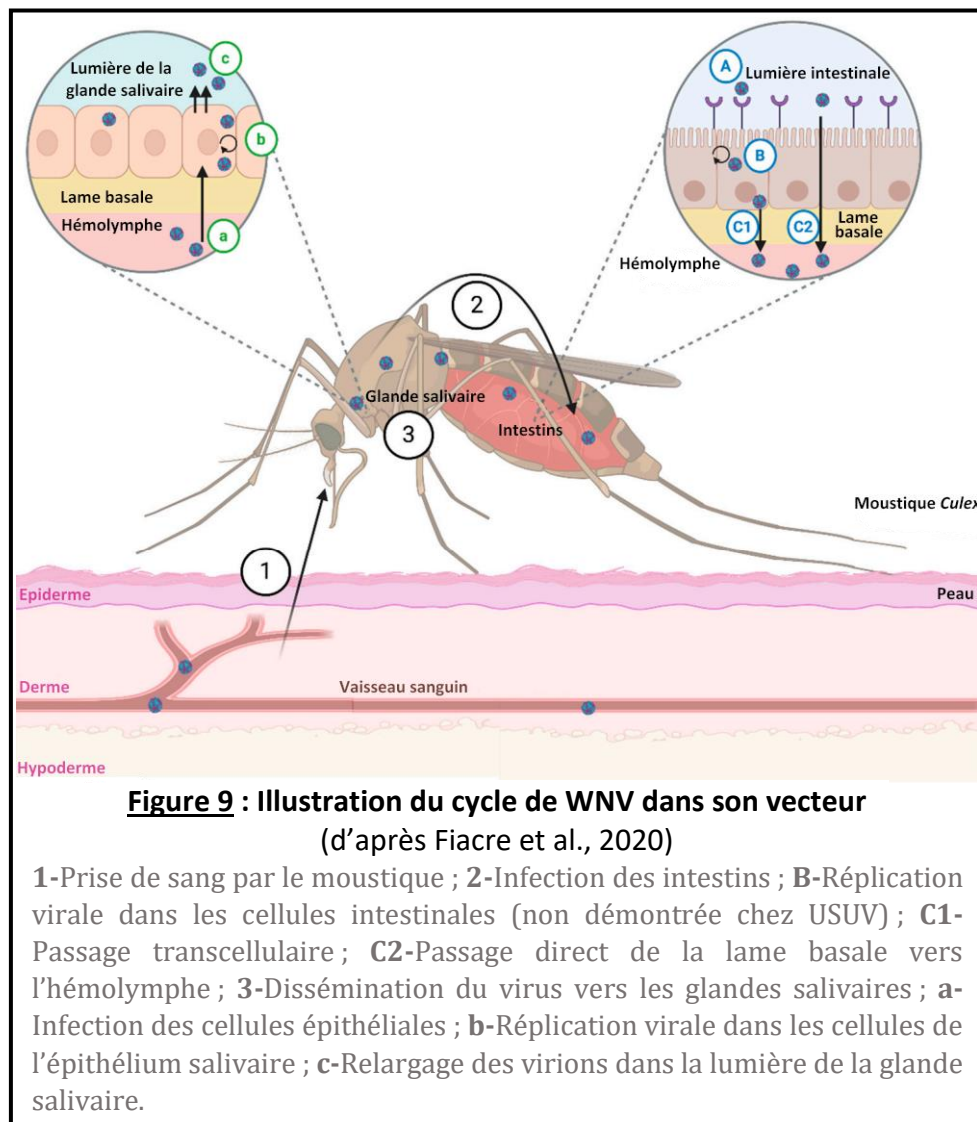
Si la capacité à transmettre le virus a été démontrée en laboratoire chez seulement trois espèces de moustiques *Culex* (*C. neavei*, *C. pipiens* et *C. quinquefasciatus*) (Cook et al., 2018) de nombreuses autres espèces du genre *Culex* ont été incriminées, dont *Culex modestus* en République Tchèque et en Italie (Clé et al., 2019) ou encore *Culex perexiguus* en Espagne (Vázquez et al., 2011).

Le genre *Aedes* a été décrit plus récemment comme porteur du virus, surtout *Aedes japonicus*. Le virus Usutu a également été retrouvé dans d'autres genres de moustiques, tels qu'*Anopheles sp* ou *Culisetta sp*, mais avec une importance moindre (Clé et al., 2019).

b. Modalités d'infection

L'infection du vecteur par le virus repose sur le cycle de reproduction du moustique. Après avoir été fécondées, les femelles moustiques recherchent des hôtes pour leur prélever du sang, nécessaire à la maturation de leurs œufs. Ainsi les espèces de moustiques porteuses d'Usutu se contaminent au cours d'un repas sanguin sur un hôte virémique (**figure 9**). Une fois le sang ingéré, il est absorbé dans l'intestin du moustique (Kuno et Chang, 2005) (**figure 9 – 2**).

Chez la majorité des arbovirus vectorisés par des moustiques, le virus se fixe sur l'épithélium intestinal grâce à des récepteurs épithéliaux et traverse la barrière épithéliale intestinale (Kuno et Chang, 2005) (**figure 9-A**). Il atteint ensuite les glandes salivaires du moustique (**figure 9-3**), à partir desquelles il est transmis à son hôte définitif (Fiacre et al., 2020).



Chez certains Flavivirus, telle que la dengue, il apparaît que le portage du virus augmente le temps consacré à la recherche d'un hôte par le moustique vecteur (*Aedes aegypti*), ainsi que le temps de nourrissage, favorisant ainsi la transmission du virus à l'hôte définitif (Platt et al., 1997). Cette augmentation de l'attraction pour l'hôte pourrait s'expliquer par une modification neuronale consécutive à l'action du flavivirus, comme retrouvé sur les neurones liés à la vision lors d'infection par le virus de l'encéphalite japonaise chez *Culex pipiens* (Kuno et Chang, 2005). L'influence du virus sur le comportement de ses vecteurs n'a cependant pas été étudiée chez USUV.

c. Cycle d'infection

Les moustiques vecteurs d'USUV sont des espèces ornithophiles, c'est-à-dire incluant des espèces aviaires comme hôte primaire dans leur cycle de développement (Clé et al., 2019) (**figure 10**).

Le virus circule durant la période d'activité des moustiques, de fin mai à novembre (Grottola et al., 2017), et plus particulièrement durant la période propice à la vectorisation (**figure 10**), les températures chaudes semblant favorables à la transmission d'USUV, notamment par *Culex pipiens* (Fros et al., 2015). Ceci est corroboré par une étude des paramètres observés lors des épizooties de 2001 à 2005 en Autriche (Rubel et al., 2008).

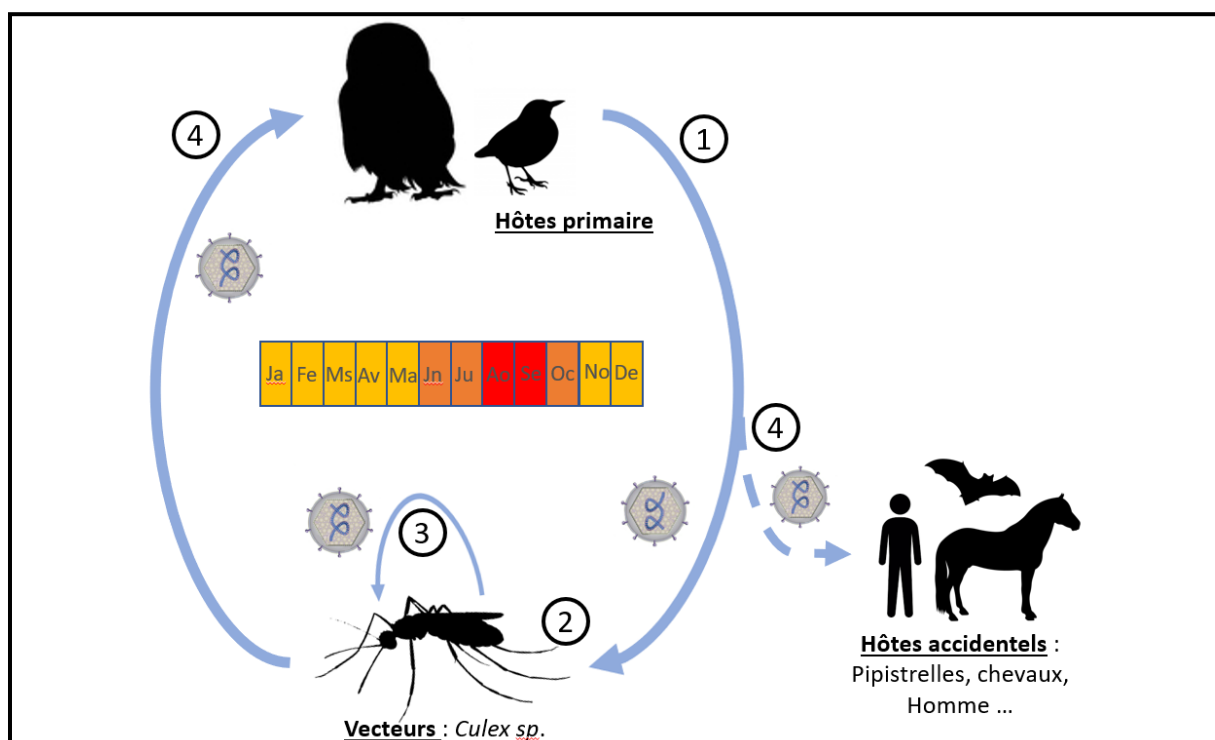


Figure 10 : Schéma du cycle de l'infection par le virus Usutu et des périodes d'activité du virus (Image personnelle)

La frise chronologique des mois concernés par les épizooties : en jaune, les mois non concernés, en orange ceux à transmission modérée et en rouge ceux à forte transmission ; 1-Contamination du vecteur lors d'un repas sanguin ; 2-Réplication virale dans le vecteur ; 3-Transmission transovarienne chez les vecteurs ; 4-Transmission du virus du vecteur vers l'hôte au cours d'un repas sanguin.

L'étude de Cadar et collaborateurs de 2017 explique cette influence par une hausse de la réplication du virus Usutu en cas de fortes températures, associée à une augmentation de l'activité et du nombre des vecteurs (Cadar et al., 2017). Par ailleurs, il a été démontré que dans le cadre d'une infection par WNV, l'augmentation de la température raccourcissait la latence entre deux prises de repas sanguins par les vecteurs et diminuait la durée du cycle viral, d'où des pics saisonnier d'infectiosité en période estivale (Paz, 2015). L'épizootie de 2018 pourrait ainsi être due aux conditions particulièrement favorables observées, puisqu'il s'agit du deuxième été le plus chaud depuis le début de XX^e siècle (Decors et al., 2019).

Même si le mécanisme de maintien du virus durant la période hivernale n'a pas encore été totalement élucidé, l'hypothèse la plus souvent retrouvée est la persistance du virus au sein d'hôtes réservoirs. Cependant, il semblerait également que le virus puisse survivre au sein de son vecteur en hiver (Weissenböck et al., 2003). Ainsi, si la transmission directe de l'hôte au vecteur semble être la voie principale de transmission du virus aux moustiques, une transmission de la femelle à sa progéniture (**figure 10-3**) ne peut être écartée et pourrait contribuer à la propagation du virus en dehors de la période estivale (Clé et al., 2019).

3) Spectre d'hôtes

Le virus Usutu est responsable de très nombreux cas de mortalité au sein de l'avifaune sauvage. Cible préférentielle des principaux vecteurs du virus, les oiseaux sont aussi les hôtes principaux du virus. USUV a ainsi été retrouvé chez 93 espèces de 35 familles différentes d'oiseaux (Benzarti et al., 2019).

a. Hôtes primaires

Le virus Usutu atteint une grande diversité d'espèces d'oiseaux, les plus fréquemment décrites étant les Strigiformes (chouette lapone, chouette harfang, chouette de l'Oural ...), les Passeriformes (merle noir, pie, hirondelle rustique, grive musicienne ...), les Accipitriformes, les Galliformes, les Falconiformes, les Piciformes et les Columbiformes (Clé et al., 2019; Saiz et Blazquez, 2017 ; Weissenböck et al., 2002).

En Europe, l'espèce la plus atteinte est le merle noir (*Turdus merula*) (**figure 11**), Passeriforme de la famille des Turdidés, très répandu et principal réservoir connu du virus. L'espèce a été très touchée par les épizooties européennes depuis 20 ans, avec près de 50 000 morts en Autriche en 2001 (Kuchinsky et al., 2020). Les merles noirs cumulent ainsi 60 % des cas symptomatiques chez l'oiseau en Europe (Decors et al., 2019). Il n'existe pour l'instant pas de cause connue à la forte sensibilité du merle noir pour ce virus, mais il semblerait que sa large répartition en Europe et son abondance soient des facteurs favorisants.



Figure 11 : Merle noir (*Turdus merula*) ©BASC

Les Strigiformes sont également très sensibles à l'infection par USUV, surtout la famille des Strigidés et notamment les chouettes laponnes (*Strix nebulosa*) (figure 12), d'où la préoccupation croissante des parcs zoologiques pour cette affection.



Figure 12 : Chouette lapone (*Strix nebulosa*) ©Dejan Velickovic

Toutefois la majorité des espèces porteuses du virus sont peu sensibles à ce dernier et sont fréquemment asymptomatiques, notamment les Accipitriformes, qui s'avèrent massivement séropositifs lors d'études sérologiques (Fantuzzi, 2021 ; Michel et al., 2018), les Galliformes comme la poule domestique (*Gallus domesticus*) et d'autres espèces domestiques telle que l'oie cendrée (*Anser anser*) (Decors et al., 2019 ; Steinmetz et al., 2011).

En France, seulement sept espèces endémiques, principalement des Passeriformes, sont connues à ce jour pour présenter une expression clinique de l'infection par le virus Usutu (Decors et al., 2019). La sensibilité des espèces de Passeriformes exotiques n'a en revanche jamais été étudiée (Steinmetz et al., 2011).

b. Hôtes accidentels

Le premier cycle de transmission du virus Usutu proposé impliquait uniquement des espèces d'oiseaux (Weissenböck et al., 2003). Mais plusieurs études récentes tendent à montrer un portage asymptomatique par différents mammifères. En effet, il est fréquent d'observer une séropositivité dans les régions d'enzootie des flavivirus, même au sein de populations asymptomatiques et d'espèces non cibles (Simpson, 1993).

Au Sénégal, des souches de la lignée Africa 2 ont été retrouvés chez quatre spécimens asymptomatiques de rats (*Rattus rattus* et *Mastomys natalensis*) en RT-PCR USUV (Diagne et al., 2019), dont le rôle en tant qu'espèces réservoir reste à explorer. La résistance des rongeurs au virus est commune pour de nombreux flavivirus (YFV, SLEV, JEV, MVEV ...) et est due à des gènes murins spécifiques (Kuno and Chang, 2005).

USUV a également été isolé en 2013 en Allemagne chez des pipistrelles (*Pipistrellus sp.*), qui pourraient agir comme des hôtes amplificateurs (Cadar et al., 2014 ; Constant et al., 2020).

Une atteinte des équidés est possible, comme le montrent certaines études (Saiz et Blazquez, 2017 ; Savini et al., 2011), mais sans preuve d'expression clinique. L'étude de Constant et collaborateurs, menée au zoo de Montpellier entre 2016 et 2018, tend à montrer que des anticorps anti-USUV sont retrouvés chez plusieurs espèces de mammifères, principalement des Canidés (Constant et al., 2020).

c. *Zoonose rare*

Le terme **zoonose** décrit une maladie infectieuse transmissible d'un animal vertébré à l'homme ou inversement, par voie vectorielle ou non (OMS, 2020). Le virus Usutu fait partie du complexe de l'encéphalite japonaise, complexe qui regroupe divers flavivirus zoonotiques neuro-invasifs, responsables d'encéphalite chez l'homme (Benzarti et al., 2019 ; Vázquez et al., 2011a). USUV ne fait pas exception, puisque si l'infection est souvent asymptomatique chez l'homme, des cas plus graves avec fièvre persistante à 39.5°C, maux de tête, raideur nucale, éruptions cutanées, encéphalite et méningo-encéphalite ont été reportés à plusieurs reprises (Saiz et Blazquez, 2017 ; Vázquez et al., 2011a).

Le tout premier cas d'atteinte symptomatique chez l'homme a été décrit en 1985 en République centrafricaine (Clé et al., 2018). En Europe, les deux premiers cas d'infection symptomatique chez l'homme ont été décrits en Italie en 2009 (Clé et al., 2018 ; Pecorari et al., 2009), chez un patient immunodéficient atteint d'un lymphome B à grandes cellules, présentant une méningoencéphalite associée à de la fièvre et chez une femme qui venait de subir une greffe du foie.

La majorité des cas sont des découvertes fortuites de cas asymptomatiques. Ainsi, des réactions de polymérisation en chaîne (PCR) réalisées sur le sang de donneurs sains en Italie (Vázquez et al., 2011a), en Allemagne (Clé et al., 2021), en Autriche et aux Pays Bas ont révélé la présence d'ARN viral d'USUV.

Les principales lignées de souches zoonotiques responsables d'encéphalite chez l'homme sont Eu2 (13 cas sur 24), Af2 et Eu3 (Roesch et al., 2019). La lignée Europe 2 présente le plus de mutations, dont une substitution du domaine de la protéine NS5, retrouvée chez WNV, JEV et MVEV, tous trois neuro-invasifs, et qui pourrait donc être reliée à sa capacité d'infecter l'homme. De plus, les résultats de l'étude in vitro de Clé et collaborateurs (Clé et al., 2021) montrent que la lignée Eu2 infecte les astrocytes humains plus efficacement que les autres lignées et se réplique plus longtemps.

Bien que les atteintes humaines semblent sporadiques, l'étude de Grottola et collaborateurs (Grottola et al., 2017) suggère que les cas d'infections symptomatiques humains par USUV sont plus fréquents que ceux dus au virus West Nile, durant les quatre années que comporte l'étude.

Ainsi, jusqu'en 2021, une centaine de cas humains graves ont été reportés, principalement en Europe, souvent avec une atteinte neurologique (Clé et al., 2021), dont 47 cas en France en 2018 (Kuchinsky et al., 2020).

Il semblerait que les cas d'atteinte symptomatique d'USUV reportés chez l'homme soient principalement des cas d'infection de patients immunodéficients. Un cas de paralysie faciale idiopathique chez un patient sans antécédents médicaux en France en 2016 tend cependant à remettre en question l'innocuité du virus chez les individus immunocompétents (Simonin et al., 2018). L'expression clinique de l'atteinte par USUV chez l'homme reste encore à préciser (Clé et al., 2019).

C. Symptômes associés

Si le virus Usutu circule à bas bruit chez nombre d'espèces, il peut être à l'origine d'atteintes suraiguës chez certaines espèces sensibles, telles que le merle noir (*Turdus merula*) ou la chouette lapone (*Strix nebulosa*).

1) Troubles généraux

Lorsque l'infection par USUV est symptomatique, elle est couramment associée à une atteinte de l'état général, avec un abattement marqué accompagné d'anorexie et d'amaigrissement (Clé et al., 2018 ; Weissenböck et al., 2002). La présence de plumes ébouriffées est également un indicateur de la débilitation de l'oiseau (**figure 13**). Les cas de mort subite ou suraiguë ne sont pas rares.



Figure 13 : Merle noir (*Turdus merula*) prostré porteur du virus Usutu ©L. Evesque - OFB, SD 18
Merle sévèrement abattu et présentant des plumes ébouriffées

2) Troubles neurologiques

Les troubles nerveux sont les symptômes prédominants observés lors de l'infection par USUV. Les symptômes présentés par les oiseaux sont souvent frustes et tardifs. Cependant l'atteinte neurologique est souvent l'atteinte la plus visible lors d'infection par le virus Usutu. Elle se traduit par des pertes d'équilibre, des convulsions, de la paralysie ou de l'ataxie (**figures 14 et 15**) (Decors et al., 2019 ; Giglia et al., 2021).

La lignée Europe 2 a la particularité d'engendrer des tremblements et des convulsions (Clé et al., 2021), symptômes partagés avec le virus zika.



Figure 14 : Atteinte neurologique chez une chouette lapone (*Strix nebulosa*)

©J.Lahoreau - OFB

Cette chouette présente une anisocorie, un nystagmus et une procidence de la 3^e paupière



Figure 15 : Perte d'équilibre chez un merle noir (*Turdus merula*) infecté par USUV

©R.Rouxel - OFB

II/ Les lésions engendrées par le virus Usutu

Le tropisme d'un virus correspond à l'ensemble des cellules cibles sensibles à ce virus et donc aux organes préférentiellement atteints (Vabret and Miszczak, 2010).

La majorité des flavivirus vectorisés par des moustiques *Culex* sont neurotropes (Holbrook, 2017). Comme le montre l'atteinte neurologique fréquemment observée chez les oiseaux infectés, c'est également le cas d'USUV, dont le principal tropisme est neurologique (71-100 % d'infection du système nerveux chez le merle et 100 % chez la chouette lapone). Le virus Usutu présente également un tropisme splénique (83-88 % chez la chouette lapone et 35-100 % chez le merle) et hépatique (32-82 % chez le merle noir) marqué, d'après les études de Chvala menée sur 33 oiseaux positifs en RT-PCR (Chvala et al., 2004) et de Giglia menée sur 160 merles noirs (Giglia et al., 2021). D'après ces études, USUV se retrouve également dans le proventricule (86 % chez la chouette lapone et 78-84 % chez le merle noir), le myocarde (73-86 % chez le merle et 78 % chez la chouette lapone), les reins (53 % des merles noirs) et les poumons (21-92 % selon l'espèce et la source) (Chvala et al., 2004). Les pourcentages obtenus varient parfois considérablement d'une étude à l'autre, mais la plupart concordent pour un tropisme assez marqué pour le foie, la rate, le cerveau, les poumons et le cœur (Bakonyi et al., 2007 ; Chvala et al., 2004 ; Höfle et al., 2013 ; Rijks et al., 2016)

A. Particularités de l'histologie des oiseaux

L'interprétation histologique d'organes d'oiseaux impose de bien connaître l'histologie particulière de ces derniers, en raison des différences structurelles et physiologiques importantes entre oiseaux et mammifères. En effet l'identification des lésions ne peut s'effectuer qu'au regard de connaissances de l'anatomie et de la physiologie des oiseaux.

1) Caractéristiques macroscopiques et histologiques de chaque organe

a. *Structures vasculaires*

Les oiseaux partagent avec les reptiles la particularité d'avoir des érythrocytes nucléés. De forme allongée, ils sont de taille plus importante que les érythrocytes anucléés des mammifères (Liebich, 2019). Les vaisseaux sanguins sont constitués de cellules endothéliales en contact direct avec la lumière vasculaire.

En cas d'autolyse, les érythrocytes se dégradent et libèrent leur hémoglobine et leur noyau, ressemblant alors à de petits lymphocytes ou à des plaquettes (thrombocytes), puis à des plaques éosinophiles, pouvant être confondues avec des thrombi de fibrine.

b. *Histologie cérébrale*

Le système nerveux central est composé du cervelet, de l'encéphale et du tronc cérébral, communément regroupés sous l'appellation de cerveau, et de la moelle épinière (**figure 16**). Le cerveau est constitué d'une enveloppe (les méninges) et d'un parenchyme (l'encéphale) composé lui-même de la substance grise et de la substance blanche. Contrairement à celui des mammifères, l'encéphale des oiseaux est lisse.

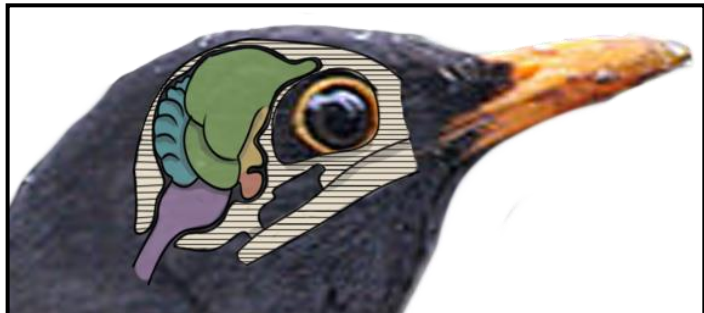


Figure 16 : Schéma de la structure du cerveau du merle noir (*Turdus merula*) (figure personnelle)

En vert l'encéphale, en bleu le cervelet, en jaune le lobe optique, en rouge l'hypophyse et en violet le tronc cérébral

Les tissus du système nerveux central sont composés de neurones (**figure 17-1**), et de la névroglie, ensemble des oligodendrocytes, des astrocytes, des cellules microgliales et des épendymocytes. Les astrocytes (**figure 17-2**) sont les plus grandes cellules gliales. Les oligodendrocytes (**figure 17-3**) sont de petites cellules au noyau condensé et leur cytoplasme n'est pas coloré en coloration hémalum-éosine (HE).

Les cellules microgliales ou microglies (**figure 17-4**) sont des cellules phagocytaires mononucléées qui assurent la réponse immunitaire cérébrale (Liebich, 2019). Elles sont de petite taille et leur noyau est volumineux et de forme allongée. Leur cytoplasme basophile et granuleux, contient des phagosomes (Boulhal, 2015).

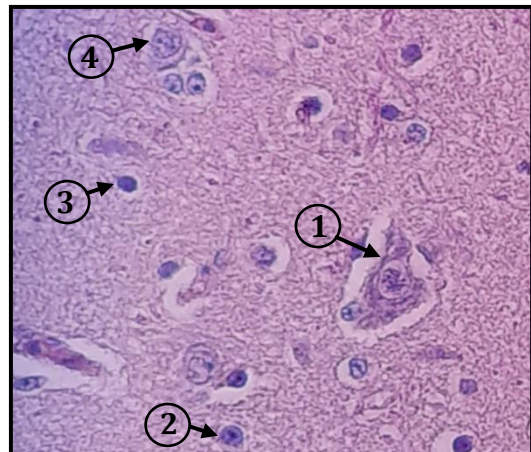


Figure 17 : Structure histologique du parenchyme de l'encéphale d'un merle noir (image personnelle)

1-neurone ; 2-astrocyte ; 3-noyau d'un oligodendrocyte ; 4-cellule microgliale

Le cervelet présente une couche de cellules granuleuse, pouvant être confondues avec des granulocytes (**figure 18**)

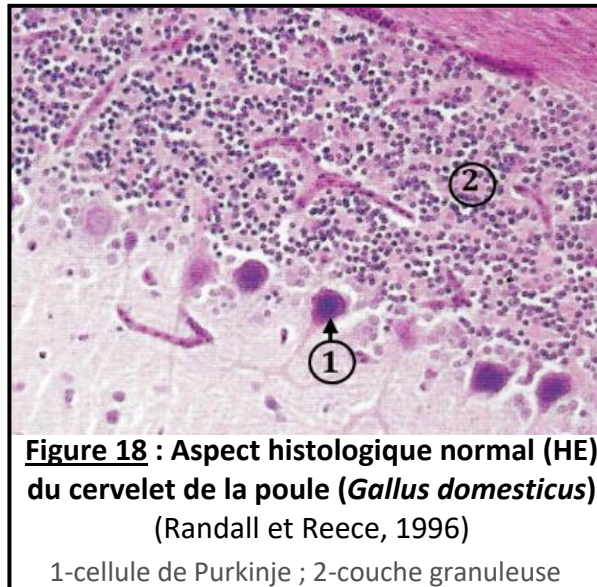


Figure 18 : Aspect histologique normal (HE) du cervelet de la poule (*Gallus domesticus*)
(Randall et Reece, 1996)
1-cellule de Purkinje ; 2-couche granuleuse

c. Histologie splénique

La rate est principalement constituée de la pulpe blanche et de la pulpe rouge, dont la distinction est beaucoup moins marquée chez les oiseaux que chez les mammifères. Les centres germinatifs entourent une artère centrale. La pulpe blanche (**figures 19 et 20-1**) est constituée de vaisseaux et apparaît sous forme d'îlots plus pâles dominés par des cellules lymphoïdes, au milieu de la pulpe rouge (**figures 19 et 20-2**), qui est un tissu éosinophile (Randall et Reece, 1996).

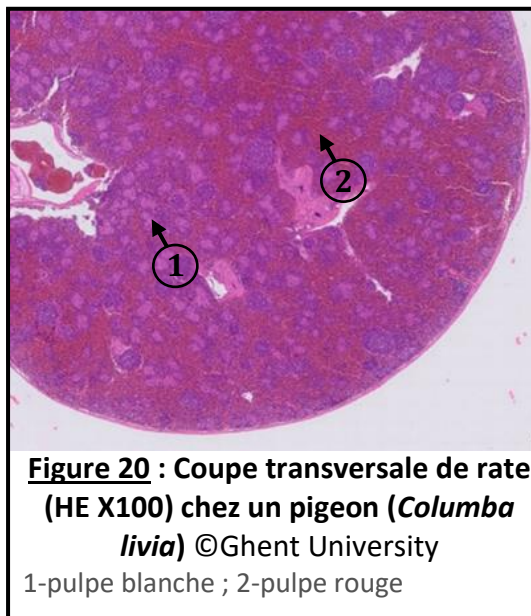


Figure 20 : Coupe transversale de rate (HE X100) chez un pigeon (*Columba livia*) ©Ghent University
1-pulpe blanche ; 2-pulpe rouge

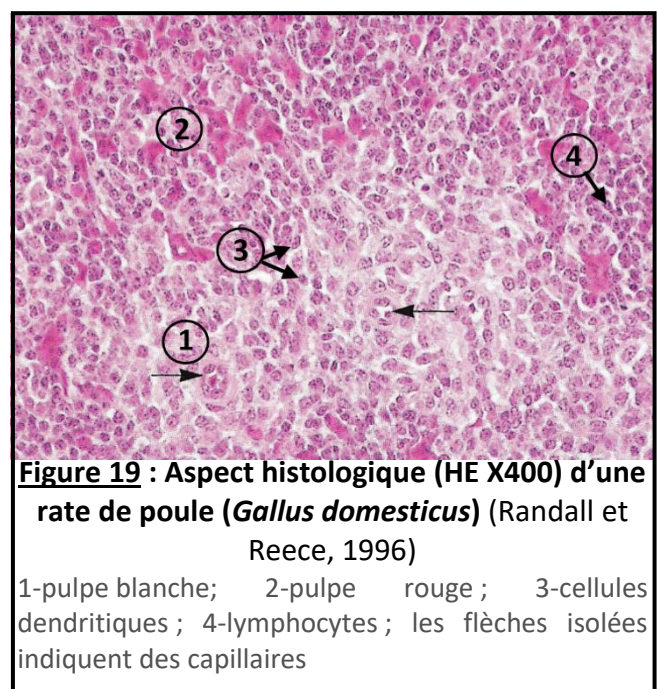


Figure 19 : Aspect histologique (HE X400) d'une rate de poule (*Gallus domesticus*) (Randall et Reece, 1996)
1-pulpe blanche; 2-pulpe rouge ; 3-cellules dendritiques ; 4-lymphocytes ; les flèches isolées indiquent des capillaires

Le tissu splénique contient des érythrocytes en abondance, des lymphocytes B, des granulocytes, ainsi que des macrophages (Randall et Reece, 1996). Une augmentation du nombre de granulocytes spléniques (granulocytose) est fréquente lors de splénite. Les granulocytes sont alors phagocytés par les macrophages, dont les granules cytoplasmiques apparaissent alors moins marqués par la coloration.

d. Histologie hépatique

Le foie des oiseaux est bilobé et comporte une organisation plus simple que celui des mammifères. En effet, les lobules hépatocytaires ne sont pas séparés par des septa fibreux et ne sont donc pas aussi clairement définis que chez les mammifères.

Les hépatocytes sont structurés en travées hépatocytaires irrégulières, auxquelles les capillaires sinusoides s'anastomosent librement (Faraj, 2016). Chez de nombreuses espèces d'oiseaux, les travées hépatocytaires (**figure 21**) sont larges de deux noyaux (Faraj, 2016; Randall et Reece, 1996).

Les capillaires sinusoides sont accompagnés de cellules endothéliales fines et aplaties, ainsi que de cellules de Kupffer (**figure 22**), cellules macrophagiques présentes uniquement dans le foie. Elles se distinguent des hépatocytes par une forme allongée et des prolongements cytoplasmiques et sont plus épaisses que les cellules endothéliales (Randall et Reece, 1996).

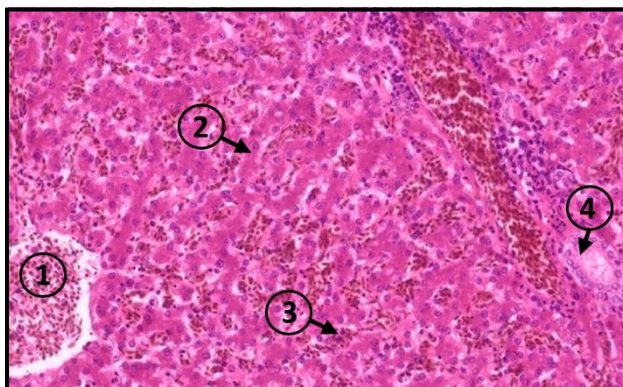


Figure 21 : Aspect histologique (HE X250)
du foie d'un pigeon (*Columba livia*)

© Ghent University

1-veine centro-lobulaire ; 2-travée hépatocyttaire ;
3-capillaire sinusoides ; 4- conduit biliaire

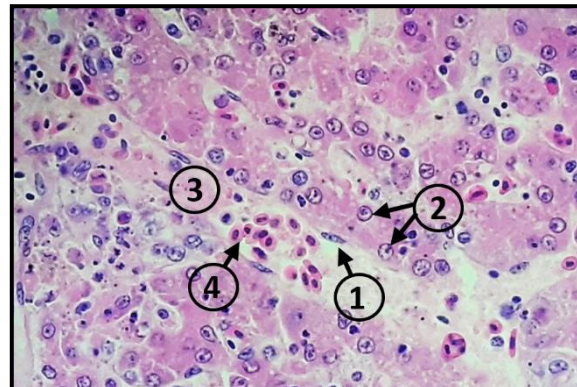
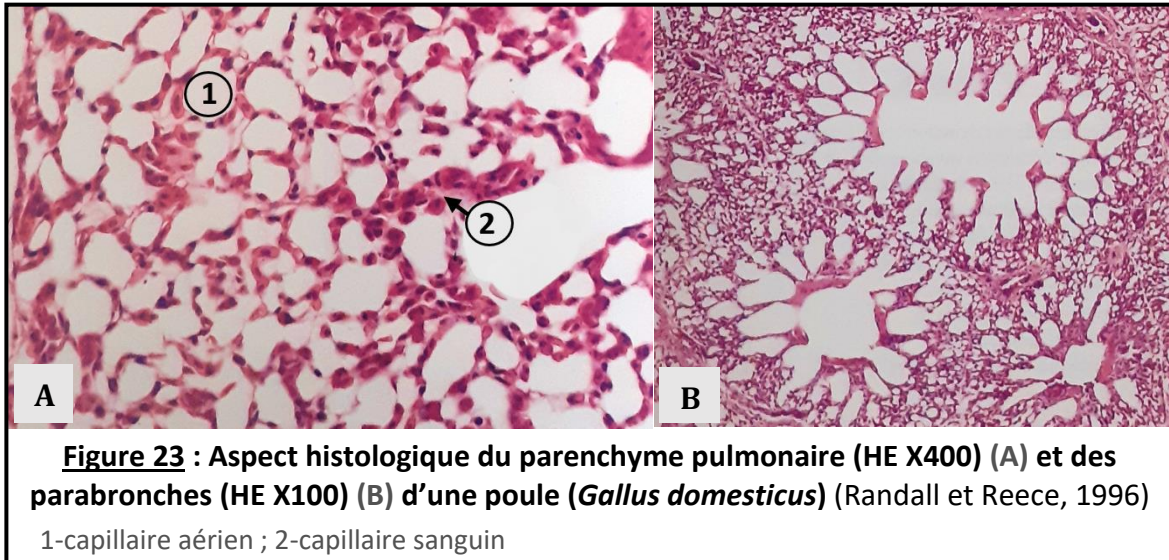


Figure 22 : Aspect histologique (HE X400)
du foie d'une chouette lapone (*Strix nebulosa*) (image personnelle)

1-cellule de Kupffer ; 2-Noyaux d'hépatocytes ;
3- capillaire sinusoides ; 4-érythrocytes

e. Histologie pulmonaire

Les oiseaux possèdent un appareil respiratoire très particulier. Au lieu d'échanges alvéolaires, les échanges gazeux se font entre des capillaires aériens et les capillaires sanguins des lobes parabronchiaux (**figure 23-A**), situés à proximité de parabronches (**figure 23-B**). Ces dernières correspondent à des bronches terminales chez les oiseaux (Randall et Reece, 1996).



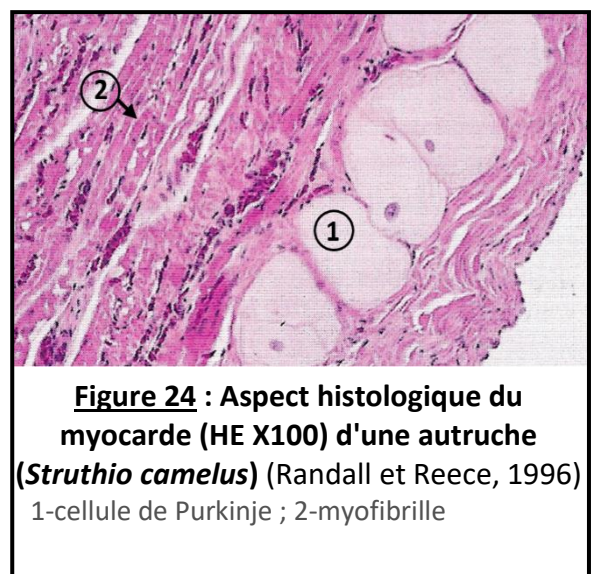
Des macrophages sont présents dans la lumière alvéolaire, en faible nombre chez les oiseaux sains, de même que les granulocytes (Randall et Reece, 1996).

En post-mortem, des érythrocytes sont fréquemment retrouvés dans les alvéoles et constituent un artéfact.

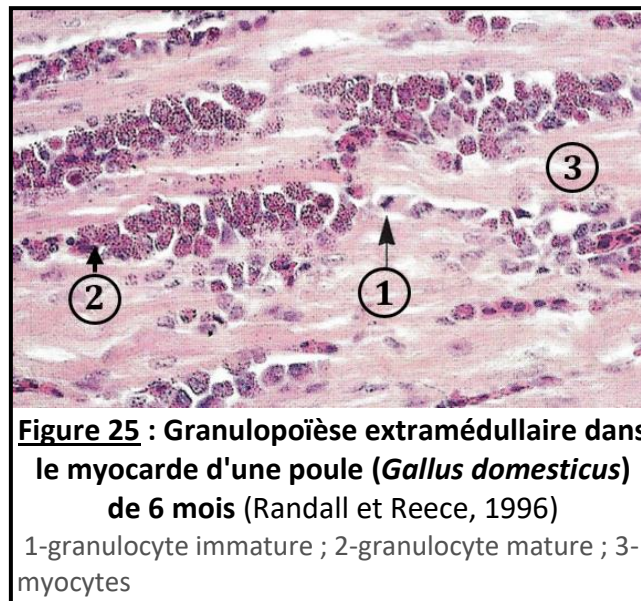
f. Histologie cardiaque

Le cœur des oiseaux est semblable à celui des mammifères, il est séparé en deux ventricules et deux oreillettes, entourés d'un péricarde (Kubale et al., 2018).

Le cœur est composé de trois couches : l'**épicarde** (formé de cellules mésothéliales, de tissus adipeux et de conjonctif), le **myocarde** et l'**endocarde**. Le myocarde est constitué de cellules musculaires lisses reliées entre elles, les myocytes formant des myofibrilles (**figure 24**). Alors que chez ces derniers, la granulopoïèse, c'est-à-dire la génération de nouveaux granulocytes, a lieu dans la moelle osseuse, celle des oiseaux est en partie extra médullaire. En effet, le myocarde des jeunes oiseaux présente la particularité de participer à la granulopoïèse extra médullaire (Julian, 2002).



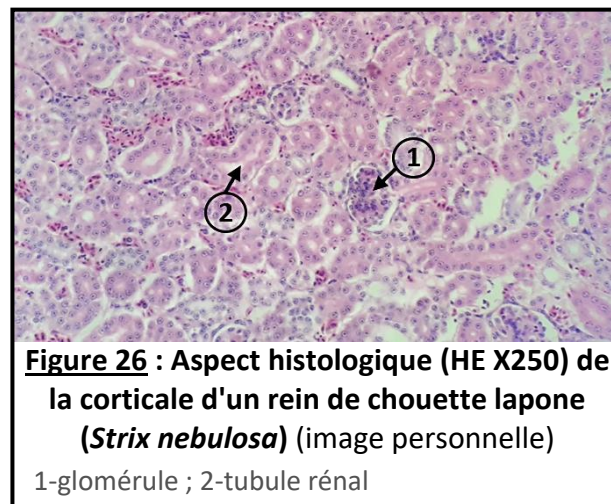
On observe ainsi physiologiquement entre les myofibrilles des amas de granulocytes, pouvant être confondus avec de la congestion ou de l'inflammation (**figure 25**).



L'endocarde est en partie composé de cellules de Purkinje, qui font partie du système cardionecteur à l'origine de la contraction cardiaque systolique. Ces cellules sont nettement identifiables car elles sont environ cinq fois plus grandes que les myocytes.

g. Histologie rénale

Les néphrons, unité structurelle du rein, sont de deux types chez les oiseaux. Les néphrons corticaux (**figure 26**), plus nombreux, sont proches des néphrons retrouvés chez les reptiles. Les néphrons médullaires ont une structure similaire à celle des néphrons des mammifères. Les oiseaux possèdent un système porte rénal, responsable du drainage des membres pelviens et des viscères via les veines interlobulaires.



2) Aspect histologique de l'inflammation

L'inflammation chez les oiseaux est très semblable à celle observée chez les mammifères. Un œdème et une congestion sont retrouvés en région péri-vasculaire suite à la libération d'amines vasoactives par les polynucléaires basophiles et les mastocytes (Randall et Reece, 1996).

Dans les 3h suivant l'initiation de l'inflammation, les hétérophiles affluent sur le site inflammatoire et dégranulent à leur tour (**figure 27**). Les hétérophiles possèdent un rôle similaire aux polynucléaires neutrophiles des mammifères, exception faite de certaines espèces telles que le lapin qui possèdent aussi des hétérophiles. Ainsi, leur cytoplasme contient de nombreux lysosomes et un noyau bilobé ("Diagnostic Value of Hematology | IVIS," 2009).

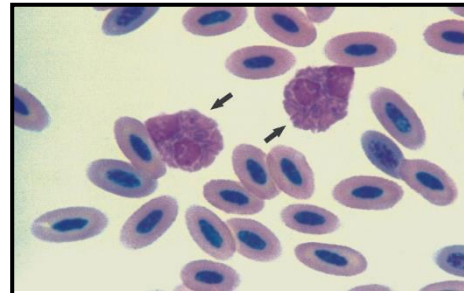


Figure 27 : Frottis sanguin d'un oiseau en coloration Wright-Giemsa ©("Diagnostic Value of Hematology | IVIS," 2009)
Les flèches noires indiquent deux hétérophiles

Cependant, leur ressemblance avec les polynucléaires éosinophiles rend leur distinction assez ardue par observation en coloration hémalum-éosine, surtout au stade immature. Le recours à différentes colorations constitue la principale méthode pour les distinguer. En raison de cette ressemblance, ils sont fréquemment regroupés sous la dénomination de granulocytes.

Lors du processus d'inflammation, des monocytes et macrophages s'ajoutent précocement aux granulocytes. Ils forment le système phagocytaire mononucléé (Belkaid et al., 1993), primordial dans la réponse immunitaire innée. Ces macrophages tendent à former, en périphérie des lésions, des cellules géantes plurinucléées en un à trois jours (**figure 28**).

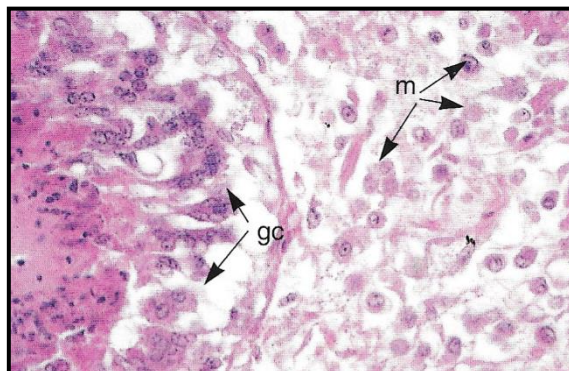


Figure 28 : Péricardite à *Escherichia coli* chez une poule (*Gallus domesticus*)
(Randall et Reece, 1996)

m : macrophages ; gc : cellules multinucléées géantes

De six heures à deux jours après le début de l'afflux de granulocytes, les lymphocytes arrivent sur le lieu de l'inflammation. L'inflammation engendre fréquemment la formation d'un granulome chez les oiseaux, qui se traduit histologiquement par l'accumulation de

macrophages, de lymphocytes et de plasmocytes (lymphocytes B différenciés producteurs d'anticorps), structurés par du tissu conjonctif (Randall et Reece, 1996).

L'inflammation du système nerveux central est différente, en raison de la présence de la barrière hémato-encéphalique qui restreint l'afflux des granulocytes et des lymphocytes. L'inflammation est donc médiée principalement par des cellules immunitaires propres au cerveau : les cellules microgliales. Elles assurent une fonction proche de celle des macrophages et monocytes. Leur rôle est d'initier et de maintenir la réponse immunitaire dans le temps pour lutter contre l'agent pathogène.

B. Pathogénie

1) Transport depuis le site d'infection

Certains flavivirus utilisent un transport lymphatique de la peau vers le sang afin de migrer vers leurs organes cibles (Kuno et Chang, 2005).

Il a été démontré chez l'homme que le virus de la dengue (Wu et al., 2000) possède une aptitude à la colonisation et à la réplication dans les cellules de Langerhans, cellules dendritiques présentatrices d'antigènes retrouvées notamment dans l'épiderme. Cette étude tend à montrer que les cellules de Langerhans sont les premières cellules à être touchées par le flavivirus. La colonisation des cellules de Langerhans est fréquemment due aux lectines, protéines d'adhésion importantes lors d'infection par le virus de la dengue, mais non nécessaires pour le virus West Nile et le virus de la fièvre jaune (Kuno et Chang, 2005). Aucune étude n'a pour l'heure démontré l'infection de cellules de Langerhans par USUV.

Ces cellules, une fois l'antigène repéré, migrent dans les nœuds lymphatiques afin de le présenter aux lymphocytes T, transportant par la même occasion le virus avec eux. Ainsi, l'infection cutanée chez la souris et chez l'homme par le virus West Nile semble être accompagnée de l'émission de cytokines, l'interleukine β -1 notamment, favorisant la migration des cellules de Langerhans vers les nœuds lymphatiques (Byrne et al., 2001). Si ce mécanisme n'est pas encore totalement élucidé, il s'agit d'une voie de transport probable du virus Usutu de la peau vers la circulation générale.

2) Entrée dans la cellule

Les mécanismes d'entrée du virus Usutu dans les cellules sont encore méconnus (Giglia et al., 2021). Chez la plupart des arbovirus (dont le JEV et le DENV), la fixation du virus aux cellules cibles, y compris les cellules non phagocytaires, se fait par liaison entre des récepteurs de l'enveloppe du virus et des glycosaminoglycanes présentes sur la membrane des cellules de vertébrés (Kuno et Chang, 2005). Si pour le MVEV, il est supposé que l'entrée se fasse par des intégrines, glycoprotéines de l'enveloppe du virus, il est démontré que c'est l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

qui est indispensable à l'entrée de WNV dans une cellule de vertébré (Fiacre et al., 2020 ; Kuno et Chang, 2005), tandis que pour le DENV-1 et 2, l'entrée s'effectue grâce à des récepteurs à la laminine.

Ainsi de nombreux flavivirus sont capables d'infecter une cellule directement, sans intervention du système phagocytaire. Une fois le virus fixé à la membrane de la cellule cible, l'entrée dans la cellule s'effectue par endocytose. Le virus est internalisé et rejoint le cytoplasme par fusion de la protéine E de son enveloppe avec la membrane endosomale, favorisée par le faible pH au sein des endosomes (Smit et al., 2011).

3) Réplication du virus

Chez le virus West Nile, les premières réplifications après inoculation ont lieu dans les kératinocytes de l'épiderme (Fiacre et al., 2020).

La réplication des flavivirus a généralement lieu dans le cytoplasme autour du noyau et fait fréquemment intervenir le système endomembranaire via le réticulum endoplasmique (Kuno et Chang, 2005). L'utilisation d'imagerie par immunofluorescence révèle que les antigènes d'USUV sont très présents dans le réticulum endoplasmique des cellules murines et humaines infectées expérimentalement (Clé et al., 2021). De plus, la réplication d'USUV est associée à une augmentation de la production de vésicules endoplasmiques, ce qui est en faveur de l'hypothèse d'une réplication au sein du système endomembranaire (Blázquez et al., 2013).

Une fois la cellule infectée, l'entrée d'USUV déclenche une augmentation significative de l'agrégation de protéines LC3, marqueurs de la formation des autophagosomes (Blázquez et al., 2013). USUV serait donc responsable d'une réaction autophagique au sein de la cellule.

L'autophagie est une réaction de défense couramment utilisée par les cellules contre les virus qui l'infectent, et qui fait intervenir des lysosomes. Ce mécanisme est cependant utilisé par certains virus dont les flavivirus à leur avantage, afin de favoriser leur réplication, hypothèse controversée chez WNV (Saiz et Blázquez, 2017). Ainsi, l'étude de Blázquez et collaborateurs (Blázquez et al., 2013) montre que l'infection par le virus Usutu favorise la formation d'autophagosome, et que la stimulation expérimentale de l'autophagie chez les mammifères augmente la réplication du virus Usutu. L'inhibition de l'autophagie au cours de cette étude a au contraire tendance à diminuer la réplication du virus, démontrant ainsi que l'autophagie pourrait être bénéfique pour USUV.

L'infection par le virus Usutu engendre également un stress endoplasmique ce qui pourrait être à l'origine des lésions majeures de nécrose observées chez les individus symptomatiques (Ashraf et al., 2015).

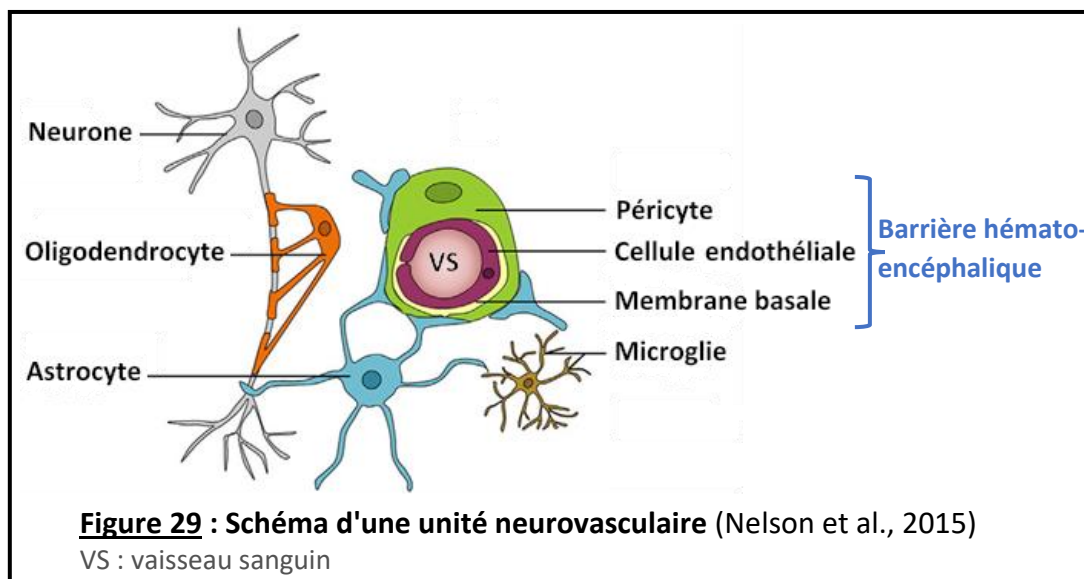
L'ARN viral d'USUV est traduit en une unique polyprotéine. Une fois matures, les virions sont externalisés ou continuent à se répliquer au sein de la cellule. La majorité des flavivirus se répliquent en 12 à 16h et pendant trois à quatre jours (Simpson, 1993). Comme étudié précédemment, cette durée d'incubation est susceptible de varier selon la température

(Cadar et al., 2017). Une hausse de température peut accélérer l'évolution du virus et donc la vitesse d'infection de l'hôte.

4) Particularités de la pathogénie dans le cerveau

La barrière hémato-encéphalique est le principal frein à la dissémination de pathogènes dans le cerveau. Cette barrière est régulée par les péricytes, cellules présentes à la surface des vaisseaux sanguins cérébraux (**figure 29**).

Une étude de 2021 (Clé et al., 2021) tend à montrer que les six lignées principales d'USUV ont la capacité de coloniser le parenchyme cérébral. Harder développe en 2002 la notion d'**unité neurovasculaire (NVU)** chez les mammifères (**figure 29**), ensemble de cellules cérébrales comprenant les neurones, les péricytes, les astrocytes, les cellules microgliales, les oligodendrocytes et les cellules endothéliales. Les mêmes structures sont retrouvées chez les oiseaux. La colonisation nerveuse se ferait principalement au niveau des cellules de la NVU et se poursuivrait par une inflammation nerveuse généralisée (Clé et al., 2021). L'étude de Clé et collaborateurs de 2021 montre que tous les types cellulaires sont touchés par une infection d'USUV in vitro, aussi bien chez la souris que chez l'homme (neurones, microglies, péricytes, cellules endothéliales et astrocytes).



Ces unités neurovasculaires sont fréquemment la cible des flavivirus neurotropes du sérotype de l'encéphalite japonaise (Hussmann et al., 2013). Or, les NVU sont indispensables dans l'immunité en contrôlant la barrière hémato-encéphalique qu'ils constituent (Liebich, 2019). Ils ont également une action directe au cours de l'inflammation, une action protectrice, par production de facteurs neurotrophiques limitant la nécrose vasculaire et une action réparatrice sur les cellules endommagées (Wang et al., 2021).

Plusieurs études ont démontré que la réplication du virus West Nile dans les cellules cérébrales précède l'atteinte de la barrière hématoencéphalique, ce qui suggère que le virus accède au cerveau par une autre voie. Les principales hypothèses sont une colonisation des

cellules endothéliales, puis une émission de virions vers le parenchyme ou une transcytose directe à travers les cellules endothéliales (Fiacre et al., 2020 ; Hussmann et al., 2013 ; Verma et al., 2009). La capacité des lignées Eu2 et Af3 d'USUV d'infecter les cellules endothéliales depuis la lumière des vaisseaux, sans compromettre l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique corrobore cette hypothèse chez le virus Usutu (Clé et al., 2021).

Une fois les virions émis dans le parenchyme cérébral, les antigènes du virus activent les cellules gliales. Ces dernières produisent alors des métalloprotéinases matricielles (enzyme possédant en leur site actif un ion métallique), qui endommagent la barrière hémato-encéphalique (Wang et al., 2021), caractéristique également partagée avec le virus West Nil (Hussmann et al., 2013). Cette fragilisation de la barrière hémato-encéphalique est à l'origine d'une neuro-invasion et de la dissémination dans le système nerveux central.

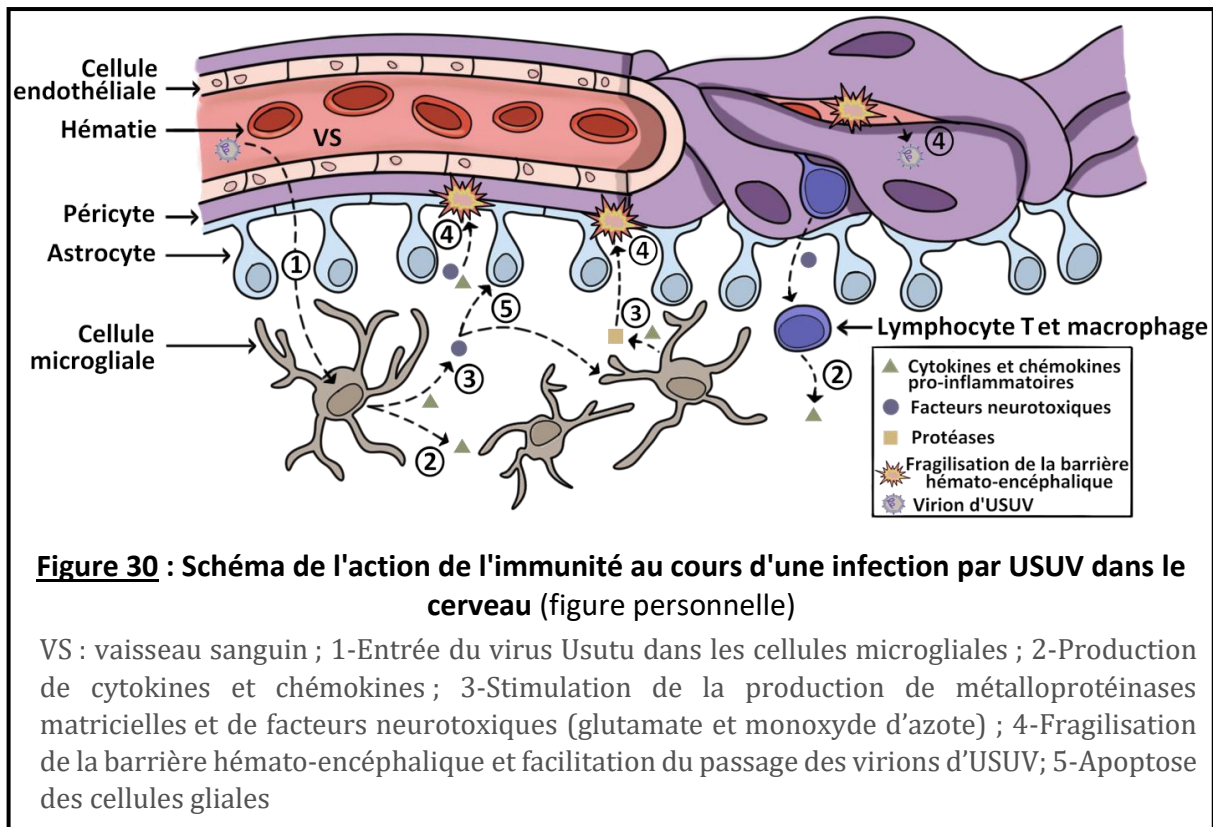
5) Réponse immunitaire de l'hôte

L'infection par USUV entraîne rapidement une forte réponse antivirale de la part de l'hôte, notamment via les cellules microgliales (dans le cerveau) et les granulocytes, avec une augmentation de l'expression de Tnf α (Tumor necrosis factor alpha), interleukine 6, interleukine β 1 et interférons β chez des souris infectées expérimentalement (Clé et al., 2021). Les interférons semblent ainsi jouer un rôle primordial dans la protection de l'hôte contre USUV. Les modèles murins adultes, considérés comme résistants au virus, deviennent d'ailleurs sensibles à ce dernier lorsqu'ils sont dépourvus de récepteurs aux interférons (Kuchinsky et al., 2020).

Chez les mammifères, il a été démontré que le virus West Nile parvient à limiter les effets des interférons dès les premières étapes de l'infection. En effet, certaines protéines codées par le WNV inhibent la transcription de gènes codants des interférons, tandis que d'autres inhibent la cascade de signalisation permettant aux interférons de cibler le virus (Diamond, 2009). Usutu est susceptible d'avoir développé des mécanismes d'évitement de la réponse immunitaire similaires.

Le rôle des cellules microgliales dans la neuro-invasion montre qu'il existe ainsi un équilibre précaire entre les médiateurs pro-inflammatoires et les mécanismes de réparation (**figure 30**). Cet équilibre est primordial et conditionne l'issue de l'inflammation. L'étude du processus inflammatoire cérébral chez les mammifères (souris et humain), montre une activation prédominante des cellules microgliales, à l'origine d'une production de cytokines pro-inflammatoires et de chémokines (cytokines chémo-attractantes), accompagnée d'un afflux de macrophages et de lymphocytes T (Clé et al., 2020 ; McGavern et al., 2002 ; Weissenböck et al., 2004), principalement dans le corps strié et le thalamus. En effet, l'expression de certains gènes clés de la production de cytokines est directement reliée à la présence d'USUV dans la cellule. Or ces cytokines pro-inflammatoires sont à l'origine d'une cascade inflammatoire profitable pour USUV (Clé et al., 2020). D'une part, elles fragilisent la barrière hémato-encéphalique, comme évoqué précédemment, et favorisent donc le passage du virus

dans le parenchyme cérébral, mais elles sont aussi directement reliées à l'apoptose cellulaire, par production de facteurs neurotoxiques tels que le monoxyde d'azote et le glutamate, à l'origine d'une mortalité des neurones sains (Weissenböck et al., 2004). De même, les chémokines entraînent un gonflement des cellules endothéliales (« endothelial cell swelling » en anglais), et une déstructuration de la barrière vasculaire.



C. Etude des lésions provoquées par USUV

Les lésions dues à la cascade immunitaire et celles dues au virus Usutu lui-même sont parfois observables histologiquement, selon la sévérité de l'atteinte. Depuis 2003, plusieurs études se sont intéressées aux lésions observées chez les oiseaux retrouvés morts infectés par le virus Usutu dans divers pays européens. Les lésions retrouvées lors d'études rétrospectives sont très proches des lésions induites lors d'infections expérimentales de mammifères par USUV et découlent directement de la pathogenèse de ce dernier.

1) Lésions microscopiques consécutives à l'infection par le virus USUV

a. Description des principales lésions

Le stress endoplasmique consécutif à l'infection par le virus Usutu et la réaction autophagique associée sont à l'origine d'une nécrose des tissus touchés (Ashraf et al., 2015).

Histologiquement, la nécrose cellulaire s'exprime généralement par des plages pâles, plus ou moins étendues et déstructurées, consécutives à la lyse des membranes cellulaires et à la

libération de leur cytoplasme (Boulton et al., 2013). La nécrose doit être distinguée de l'autolyse, qui altère les tissus en post-mortem et est consécutive à la libération par les cellules en cours de dégradation de leur contenu lysosomal (Emile et al., 2012). L'autolyse concerne généralement tout un tissu et se caractérise par une déstructuration généralisée du tissu. Chez les oiseaux, une nécrose myocardique ou rénale peut aussi être consécutive à des dépôts d'urate, lors de goutte viscérale (Julian, 2002).

Lors de nécrose dues à USUV, les plages nécrotiques sont éosinophiles, multifocales, rarement coalescentes et sont préférentiellement péri-vasculaires (**figures 31 et 32**). Lorsqu'il y a nécrose des cellules endothéliales des vaisseaux, on observe une **nécrose fibrinoïde**, qui se caractérise par un dépôt de matériel amorphe et éosinophile dans la paroi des vaisseaux, correspondant à un mélange de fibrine, d'immunoglobulines et de complexes immuns. La nécrose fibrinoïde est souvent associée à une réaction d'hypersensibilité de type III ou à des maladies auto-immunes, mais s'observe également lors de certaines atteintes virales (Damjanov, 2009).

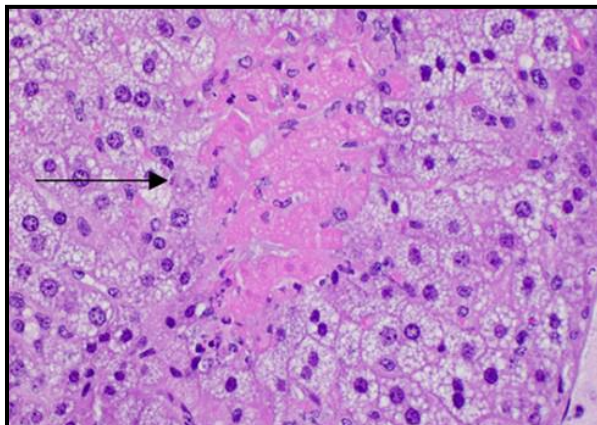


Figure 31 : Nécrose fibrinoïde hépatique chez des souris (*Mus musculus*) inoculées avec USUV (Kuchinsky et al., 2020)

La flèche indique la plage de nécrose

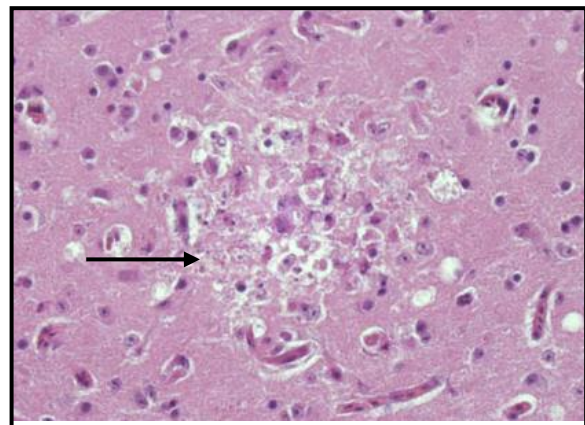


Figure 32 : Foyer de nécrose neuronale chez un merle noir (*Turdus merula*) infecté par USUV (Chvala et al., 2004)

La flèche indique la plage de nécrose

Aux lésions de nécrose cellulaire s'ajoutent celles consécutives à la réponse immunitaire adaptative de l'hôte, qui cible les cellules infectées et provoque un afflux de lymphocytes et de plasmocytes, principalement en région péri-vasculaire. Cette infiltration de cellules mononucléées est très fréquemment observée lors d'atteinte par USUV, dans les poumons (Weissenböck et al., 2004), la rate, le cœur (Steinmetz et al., 2011), le cerveau et le foie (Chvala et al., 2004). Est ainsi observée une **vascularite**, c'est-à-dire une inflammation des vaisseaux sanguins, due à l'emballement du système immunitaire (Giglia et al., 2021).

Ces lésions s'accompagnent d'une **congestion multicentrique**, visible principalement dans les organes fortement vascularisés que sont le foie, la rate, les poumons, le cœur et les reins. L'encéphale est également concerné (Höfle et al., 2013). Cette atteinte non spécifique est fréquemment retrouvée dans des cas sévères de septicémie et de choc endotoxinique, ou plus généralement de processus infectieux multicentriques, qui peuvent, lors d'une atteinte par USUV, apparaître de façon concomitante à la flavivirusose.

Certaines lésions telles que l'hémosidérose ou la goutte sont fréquemment retrouvées, sans qu'un lien direct n'ait été établi avec USUV (Chvala et al., 2004 ; Höfle et al., 2013).

Des lésions de **dégénérescence endothéliale** (« endothelial cell swelling » en anglais) sont également mentionnées dans plusieurs études (Höfle et al., 2013; Rijks et al., 2016). Il s'agit d'un effet cytopathique consécutif à l'action de chémokines, à l'origine d'un gonflement des cellules endothéliales, qui fragilise la barrière vasculaire, et notamment la barrière hémato-encéphalique, ce qui facilite le passage du virus et forme de l'œdème.

b. Particularités des lésions cérébrales

La neuro-invasion par USUV et la fragilisation de la barrière hémato-encéphalique favorise l'apparition d'une encéphalite, caractérisée par une congestion, une nécrose des neurones et des cellules de Purkinje, principalement péri-vasculaire (Chvala et al., 2004 ; Steinmetz et al., 2011). La nécrose neuronale peut s'accompagner de neuronophagie (Höfle et al., 2013).

La **neuronophagie** correspond à une phagocytose des neurones par des cellules phagocytaires, principalement des cellules microgliales. Cette phagocytose découle directement de la réaction immunitaire engendrée par la neuro-invasion par le virus Usutu.

A l'aide de récepteurs spécifiques, les cellules microgliales et les lymphocytes entourent les neurones infectés et dégénérés par autophagie. Histologiquement, cela se traduit par la formation de petits foyers de cellules microgliales et de lymphocytes, appelés **nodules microgliaux** (**figure 33**) (Höfle et al., 2013 ; Steinmetz et al., 2011). La visualisation de ces nodules est fréquemment associée à une encéphalite virale ou auto-immune (Tröscher et al., 2019).

La nécrose neuronale forme des lacunes dans la matrice fibrillaire du parenchyme cérébral, ce qui initie une **gliose**. Les astrocytes tendent à se déplacer vers les zones lésées et à les recouvrir, jusqu'à former une « cicatrice » astrocytaire (Messam et al., 2002). La gliose correspond à cette prolifération d'astrocytes à proximité des lésions du parenchyme cérébral.

Une **lymphocytolyse**, c'est-à-dire une dégénérescence et nécrose des lymphocytes est parfois observée dans le parenchyme cérébral (Steinmetz et al., 2011).

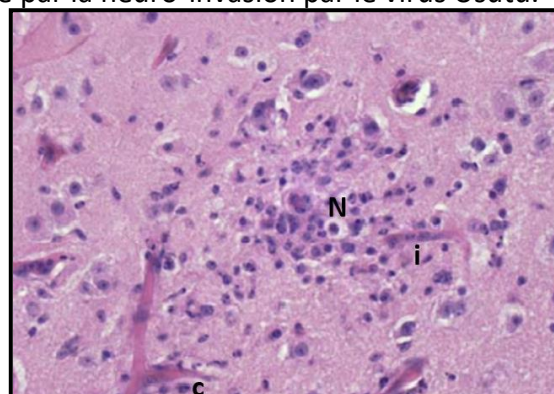


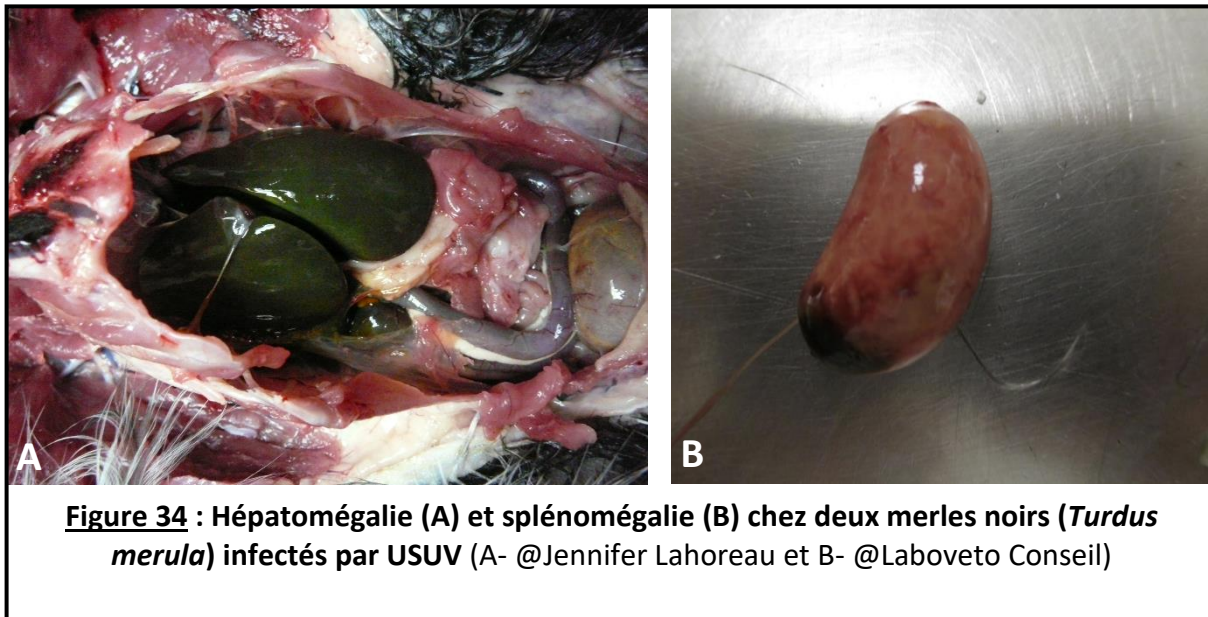
Figure 33 : Nodule microglial dans le cortex cérébral d'un merle noir (*Turdus merula*) infecté par USUV (Chvala et al., 2004)

N : Nodule microglial ; c : dégénérescence endothéliale (endothelial cell swelling) ; i : inflammation mononucléée péri-vasculaire

2) Lésions macroscopiques consécutives à l'infection par le virus Usutu

La nécrose cellulaire observée à l'histologie peut, lorsqu'elle est sévère et étendue, se traduire macroscopiquement par des plages pâles de consistance diminuée. Contrairement à l'altération post-mortem, ces modifications concernent la surface et la profondeur de l'organe.

L'autopsie des cas atteints par USUV révèle dans plus de la moitié des cas une **hépatomégalie** modérée à marquée (**figure 34-A**) chez le merle noir (*Turdus merula*) et la chouette lapone (*Strix nebulosa*) (de 50 à 78 % chez le merle noir) et une **splénomégalie** marquée à sévère chez ces deux espèces (60 à 100 % chez le merle noir selon les études) (**figure 34-B**) (Chvala et al., 2004 ; Giglia et al., 2021 ; Rijks et al., 2016 ; Steinmetz et al., 2011). La splénomégalie observée est consécutive à une hyperplasie de la pulpe rouge (Chvala et al., 2004) due à l'afflux d'érythrocytes et granulocytes dans la rate, ainsi qu'à leur dégradation (Giglia et al., 2021 ; Randall et Reece, 1996).



Les lésions endothéliales provoquées par USUV et les brèches vasculaires qui surviennent à la fois dans le cerveau, mais aussi dans le foie, les poumons et la rate (Rijks et al., 2016), peuvent se traduire histologiquement par de l'**œdème** (28 % dans l'étude Chvala et collaborateurs de 2004 chez les merles noirs), qui correspond à un afflux de liquide dans le parenchyme (Bakonyi et al., 2007 ; Messam et al., 2002).

L'infection par USUV entraîne une inflammation pouvant toucher toutes les zones cérébrales. Sont ainsi décrites lors des études précédentes des méningites, des encéphalites, mais aussi des méningo-encéphalites et des encéphalomyélites (Clé et al., 2020), que l'on peut suspecter à l'autopsie par une congestion (40 % des merles noirs dans l'étude de Giglia de 2021) ou plus rarement par des plages de nécrose (Manarolla et al., 2010).

Une hyperkératose de l'épiderme cloacal de merles noirs infectés par USUV est décrite dans deux études (Giglia et al., 2021 ; Rijks et al., 2016) sans que l'on puisse conclure à la corrélation entre le flavivirus et cette lésion. Les lésions macroscopiques visibles à l'autopsie sont ainsi très frustes et non spécifiques et la suspicion d'atteinte par le virus Usutu ne peut se faire qu'au regard des symptômes objectivés avant la mort de l'animal.

PARTIE EXPERIMENTALE

Le virus Usutu est apparu récemment en France et représente une menace encore méconnue pour les espèces qui y sont sensibles et notamment pour l'avifaune captive. L'étude post mortem est ainsi primordiale pour assurer une épidémiosurveillance au sein de la faune sauvage, mais également afin d'assurer le suivi des cas de mortalité en parc zoologique. Le principal dépistage de l'atteinte par USUV en France passe par une RT-PCR lors de mortalité suraiguë ou de mortalité à la suite de signes cliniques neurologiques. Cependant, si l'atteinte par USUV est fréquemment létale chez les merles noirs communs (*Turdus merula*) et les chouettes laponnes (*Strix nebulosa*), de nombreux cas sont asymptomatiques (Constant et al., 2020) et les signes cliniques sont non pathognomoniques. Un résultat PCR positif ne permet donc pas à lui seul d'imputer le décès à USUV, d'autant plus si aucune atteinte neurologique ante-mortem n'a été observée. En effet, la méthode PCR est très sensible et spécifique, mais elle ne permet que d'indiquer la présence de l'ARN de l'agent pathogène dans les tissus, sans préjuger des lésions occasionnées et de la cause de la mort de l'animal.

Dans ce contexte, l'histologie est une discipline intéressante pour objectiver les lésions en complément des analyses PCR et ainsi renforcer la suspicion d'atteinte par USUV, voire la confirmer.

Ce travail a pour objet de recenser par une étude rétrospective les lésions histologiques compatibles avec une infection par le virus Usutu, retrouvées chez des individus positifs en RT-PCR et d'étudier les facteurs pouvant influencer le tropisme d'organe, afin de déterminer sur quelles lésions il convient de se concentrer en cas de suspicion d'atteinte par USUV.

Au travers de ce travail, nous avons donc souhaité faire un point sur les lésions histologiques dues à USUV et à son tropisme d'organe.

I/ Contexte et objectifs de l'étude

A. Le projet Usutu

Le grand nombre de parcs zoologiques touchés en 2018 ainsi que l'intérêt grandissant de la communauté scientifique pour le virus Usutu, émergent et étroitement lié au virus West Nile, ont permis au projet Usutu de voir le jour.

Ce projet est issu de la collaboration entre les vétérinaires membres de l'Association Francophone des Vétérinaires de Parcs Zoologiques (AFVPZ), les parcs zoologiques (**annexe 1**), l'Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) de Maisons-Alfort (responsable des analyses PCR), l'ENVA (Ecole nationale vétérinaire d'Alfort) (responsable de l'immunohistochimie), le laboratoire VetDiagnostics (responsable des analyses histologiques), ainsi que l'OFB par le réseau SAGIR.

L'épizootie de 2018 a permis de recueillir de nombreux cas de mortalité au sein de l'avifaune sauvage et en parcs zoologiques, compatibles avec USUV, avec des données d'autopsie et sur lesquels ont été réalisés des prélèvements pour confirmer l'étiologie.

L'objectif était pluriel : étudier les symptômes, les lésions macroscopiques à l'autopsie et les lésions histologiques, étudier les vecteurs et évaluer les facteurs de risque dans les parcs zoologiques. Puis secondairement, de prévoir de prochaines épizooties, avec une étude sérologique des espèces sensibles captives, afin d'évaluer la prévalence et de confronter les résultats sérologiques aux futurs cas de mortalité. L'objectif final étant de mieux connaître les souches d'USUV en France, de mieux comprendre sa pathogénie et de trouver des méthodes de prévention. Cette thèse correspond au volet histologique du projet Usutu et est financée par l'AFVPZ.

B. Les hypothèses à vérifier

Trois axes d'études ont été retenus dans ce travail afin de caractériser l'infection par le virus Usutu et de mieux comprendre son historique en France.

1) Pattern lésionnel et le tropisme d'organe

Les lésions caractéristiques d'USUV sont fréquemment retrouvées dans la rate, le foie et l'encéphale (Clé et al., 2021 ; Höfle et al., 2013 ; Manarolla et al., 2010), et les études histologiques se focalisent souvent sur leur étude. Nous avons cherché à **confirmer les résultats virologiques**, mais également à affiner la recherche des lésions caractéristiques du virus Usutu, afin de se concentrer sur les **lésions intéressantes pour le diagnostic d'USUV, tant microscopiques que macroscopiques** et ainsi **déterminer les organes dont l'étude histologique présente le plus d'intérêt dans le diagnostic de l'atteinte par le virus Usutu.**

2) Recherche de facteurs influençant le tropisme d'organe et les symptômes

Les oiseaux infectés par USUV présentent des symptômes neurologiques souvent marqués, surtout les merles noirs et chouettes laponnes. Cette atteinte neurologique est cependant peu caractéristique d'un point de vue clinique et non systématiquement retrouvée à l'histologie ce qui pourrait laisser supposer que l'atteinte histologique pourrait dépendre de certains facteurs. Les symptômes et les lésions histologiques développées lors d'une atteinte par USUV sont en effet variables d'un cas à l'autre. Certaines études montrent l'effet de la souche de WNV impliquée sur le tropisme et les lésions observées (Donadieu et al., 2013 ; Hussmann et al., 2013). Nous nous sommes donc demandé si de telles différences existent entre les souches d'USUV et peuvent expliquer la variabilité d'expression lésionnelle.

Il convient alors de s'interroger sur l'existence d'autres **facteurs qui pourraient influencer le pattern lésionnel**, tels que l'âge, le sexe ou encore l'espèce de l'hôte infecté.

3) Mise en relation des lésions observées et de la présence du virus

Les lésions fréquemment observées lors d'infection par le virus Usutu sont assez peu spécifiques lorsqu'elles sont isolées, et il est nécessaire de vérifier la présence du virus au sein de celles-ci afin de pouvoir les lui attribuer. Ce travail s'intéresse donc à la **mise en évidence du virus dans les tissus et à la mise en relation avec les lésions observées**, à la fois chez des individus infectés confirmés par analyse virologique, mais aussi pour des cas plus anciens chez lesquels l'histologie seule ne permet pas de confirmer l'atteinte par USUV.

En effet, le virus Usutu circule à bas bruit dans les populations sauvages et les cas d'infection symptomatique sont le plus souvent sporadiques, hormis lors des épizooties. Le faible niveau de connaissances avant 2016, ainsi que les similitudes histologiques avec certaines affections fréquentes en parc zoologique amènent à supposer que la mortalité imputable à USUV a pu être sous-diagnostiquée avant 2016. Ceci remet en question l'émergence réelle du virus en France et son implication dans certains cas de mortalité.

II/ Matériel et méthode

L'étude de ces trois axes s'est effectuée en parallèle, d'août 2019 à mars 2022, et a débuté par une analyse des lames histologiques réalisées en grande partie lors de l'épizootie de 2018.

A. La collecte des données

1) Le plan d'échantillonnage

Depuis le début de l'épizootie de 2018, les parcs zoologiques sont enjoins par l'AFVPZ de prélever tout oiseau, mais principalement Strigiforme et Passeriforme, mort de cause suspecte, pour analyse virologique d'une part, quelle que soit la qualité de la conservation de l'animal et pour analyse histologique d'autre part, uniquement si le cadavre est encore frais, afin de suivre la progression du virus sur le territoire français.

a. Origine des prélèvements

Les prélèvements sélectionnés pour cette thèse sont ainsi issus de parcs zoologiques français (**annexe 1**), de l'OFB via le réseau SAGIR (réseau d'épidémiosurveillance de la faune sauvage), ainsi que de quelques laboratoires ayant effectué des autopsies pour des particuliers (**annexe 2**).

Étaient inclus dans l'étude des oiseaux d'espèces sensibles à USUV (Strigiformes et Passeriformes surtout) et quelques espèces non décrites comme sensibles à USUV mais dont l'analyse en RT-PCR USUV était positive.

Les prélèvements sont issus d'oiseaux morts après avoir présenté des symptômes neurologiques (ataxie, amaurose, convulsions ...) sans origine traumatique confirmée ou

morts subitement, ainsi que des oiseaux trouvés morts et collectés (surtout pour la faune sauvage) durant la période d'infectiosité théorique d'USUV, de juin à octobre. Cette dernière a été déduite de la période d'activité des vecteurs, par comparaison avec la période d'infectiosité du virus West Nile (Balenghien et al., 2006 ; Paz, 2015).

L'étude comprenait au final 30 individus, dont sept cas recueillis avant 2018, appartenant à six espèces différentes (*Turdus merula*, *Bubo scandiacus*, *Strix nebulosa*, *Strix uralensis*, *Aegolius funereus* et *Tetrao urogallus*) positifs au virus Usutu en RT-PCR (**tableau I**). Le grand tétras (*Tetrao urogallus*) présente la particularité de ne pas être une espèce connue pour être sensible à USUV.

Tableau I : Liste des espèces positives en RT-PCR USUV représentées dans l'étude histologique

Espèce	Ordre	Nombre par espèce
Merle noir (<i>Turdus merula</i>)	Passeriforme	6
Chouette lapone (<i>Strix nebulosa</i>)	Strigiforme	19
Chouette harfang (<i>Bubo scandiacus</i>)	Strigiforme	2
Chouette de l'Oural (<i>Strix uralensis</i>)	Strigiforme	1
Chouette de Tengmalm (<i>Aegolius funereus</i>)	Strigiforme	1
Grand tétras (<i>Tetrao urogallus</i>)	Galliforme	1

b. Organes étudiés

Le choix des prélèvements a été établi selon les résultats des études ultérieures (Bakonyi et al., 2007 ; Chvala et al., 2004 ; Giglia et al., 2021 ; Höfle et al., 2013 ; Manarolla et al., 2010 ; Rijks et al., 2016 ; Steinmetz et al., 2011). Nous nous sommes ainsi volontairement focalisés sur l'étude du foie, de la rate, du cerveau, du cœur, des poumons et des reins, connus pour présenter des lésions lors d'atteinte par USUV. Nous avons écarté de cette étude les intestins, le proventricule et le pancréas, dont l'étude ne fournissait pas de résultats intéressants dans les études précédentes (Giglia et al., 2021 ; Manarolla et al., 2010), même si l'étude de Chvala et collaborateurs en 2004 montre une présence du virus dans ces organes (Chvala et al., 2004).

Pour chaque décès répondant aux critères d'inclusion dans l'étude, des prélèvements représentatifs de chaque organe étudié étaient réalisés au cours de l'autopsie, afin d'être analysés en histologie. L'épaisseur des prélèvements ne devait pas excéder 1 cm, afin d'assurer des conditions de conservation optimale, le cerveau seul faisant exception à cette consigne. Il pouvait être envoyé entier ou sectionné sagittalement, le système nerveux central étant composé de lipides à travers lesquels le formol diffuse aisément. L'absence de multiples coupes limitait ainsi l'apparition d'artéfacts gênants la lecture histologique. L'étude étant rétrospective, l'échantillonnage de plusieurs cas était incomplet.

c. Conservation et transport

Le protocole standard de conservation des prélèvements histologiques utilise une solution aqueuse de formaldéhyde tamponné de 4 à 10 %. Il s'agit d'un fixateur chimique couramment appelé formol. Utilisé rapidement après la mort du sujet, le formol permet une conservation de l'architecture cellulaire et limite les modifications liées à l'autolyse et à la putréfaction (McDonough et Southard, 2017).

La réalisation de prélèvements de petite taille et l'immersion dans un volume de formol correspondant à dix fois celui de l'organe, permet une pénétration correcte du formol dans les tissus et ainsi de les conserver au mieux.

Conformément aux études antérieures, les prélèvements étaient conservés dans du formol 10 % tamponné (Giglia et al., 2021 ; Manarolla et al., 2010). Une congélation à -18°C était préconisée pour les prélèvements envoyés en analyse virologique (**figure 35**).

Protocole d'échantillonnage

Deux jeux de prélèvements à effectuer **pour 1 individu** :

foie, rate, poumon, cerveau, cœur et reins
et toute lésion notée macroscopiquement dans d'autres organes

Merci de veiller à ce que la taille des échantillons soit de 1 cm³ maximum sauf exception : il est préférable de sectionner le cerveau en deux, de manière sagittale

- Premier lot à conserver **congelé (-18°C)** jusqu'à envoi à l'adresse suivante, accompagné du questionnaire :
ANSES, Laboratoire de Santé Animale de Maisons-Alfort
LNR West Nile
UMR1161 Virologie, INRA, ANSES, ENVA
22 rue Pierre et Marie Curie
94700 Maisons-Alfort
- Second lot à conserver **formolé (Formol à 10% tamponné)**. Si conservation au delà de 48h (envoi groupé notamment), **merci de transférer les échantillons dans de l'alcool à 70°**. Avant envoi, les échantillons doivent être placés dans un triple emballage, selon les normes en vigueur et identifiés à l'aide du numéro ZIMS de l'individu et de son nom latin d'espèce. Matériel d'expédition disponible sur demande auprès de ~~Vet~~ **VetDiagnostics**.

L'envoi des prélèvements formolés s'effectue à l'adresse suivante, accompagné du questionnaire :

Laboratoire ~~Vet~~ **VetDiagnostics**
14 avenue Rockefeller
69 008 Lyon

Figure 35 : Protocole de réalisation des prélèvements

Une fois les prélèvements fixés, le transport des prélèvements est effectué à température ambiante dans un triple emballage. Tous les prélèvements ont été envoyés au laboratoire VetDiagnostics où a été réalisé le traitement des prélèvements. Lorsque le délai entre le décès et l'autopsie était trop important, aucune analyse histologique n'était réalisée, en raison de l'autolyse des prélèvements.

2) Analyses virologiques

Afin de s'assurer de la présence du virus dans nos prélèvements, des analyses virologiques ont été réalisées par le LNR (laboratoire national de recherche) de l'Anses de Maisons-Alfort, à l'unité mixte de recherche (UMR) 1161 de Virologie, sous la direction de Sylvie Lecollinet et Cécile Beck.

La méthode de référence pour l'identification d'une infection par nombre de virus est la PCR. USUV étant un virus à ARN, la méthode utilisée est celle de la RT-PCR (réaction de polymérisation en chaîne par transcription inverse) en temps réel. Elle consiste en l'amplification de l'ARN viral, ici réalisée à partir de prélèvements frais ou congelés de foie, de rate, d'encéphale et parfois de cœur.

La recherche cible en particulier le gène NS5 très présent chez le virus Usutu, mais également chez le virus West Nile. La co-circulation des deux virus étant très fréquente (Michel et al., 2018 ; Santos et al., 2022 ; Vázquez et al., 2011 ; Vittecoq et al., 2013) et les signes cliniques étant très proches, une recherche simultanée est indispensable. Ainsi, pour chaque mortalité suspecte, les cas ont été testés en RT-PCR USUV et RT-PCR WNV, afin de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse d'une infection par USUV.

1) Les archives VetDiagnostics

Parallèlement aux prélèvements réalisés dans le cadre du projet Usutu, une étude rétrospective a été menée sur les résultats d'autopsie et d'analyses histologiques, afin de retrouver des anciens cas compatibles avec USUV, mais dont on ne suspectait pas encore l'implication à l'époque, ou des cas plus récents non analysés en virologie. Ces derniers ont été réalisés par le laboratoire VetDiagnostics dans le cadre de demande d'analyses histologiques diagnostiques et ont été stockés dans une base de données et dans des archives histologiques.

Ainsi, aux 30 cas du plan d'échantillonnage initial s'ajoutent 13 cas non testés en RT-PCR USUV, appartenant à trois espèces de Strigiformes différentes (*Strix nebulosa*, *Tyto alba* et *Pulsatrix perspicillata*) et un Passeriforme (*Turdus merula*) (**tableau II**).

Tableau II : Liste des espèces non testés en RT-PCR USUV représentées dans l'étude histologique

Espèce	Ordre	Nombre par espèce
Chouette à lunettes (<i>Pulsatrix perspicillata</i>)	Strigiforme	1
Chouette lapone (<i>Strix nebulosa</i>)	Strigiforme	10
Chouette effraie (<i>Tyto alba</i>)	Strigiforme	1
Merle noir (<i>Turdus merula</i>)	Passeriforme	1

2) Les documents d'accompagnement des prélèvements

a. *Les rapports d'autopsie*

La plupart des oiseaux inclus dans l'étude ont fait l'objet d'une autopsie, au cours de laquelle ont été réalisés les prélèvements destinés aux analyses histologiques et virologiques, et qui a donné lieu à la rédaction de rapports d'autopsie, sur lesquels sont notés les commémoratifs et l'anamnèse. Ces rapports, parfois accompagnés de photographies, ont permis de recueillir les suspicions cliniques des vétérinaires, les signes cliniques observés et toute anomalie visualisée au cours de l'autopsie (**figure 36**). Ils ont systématiquement été envoyés en accompagnement des prélèvements et ont ainsi pu servir de base pour l'étude macroscopique des lésions.

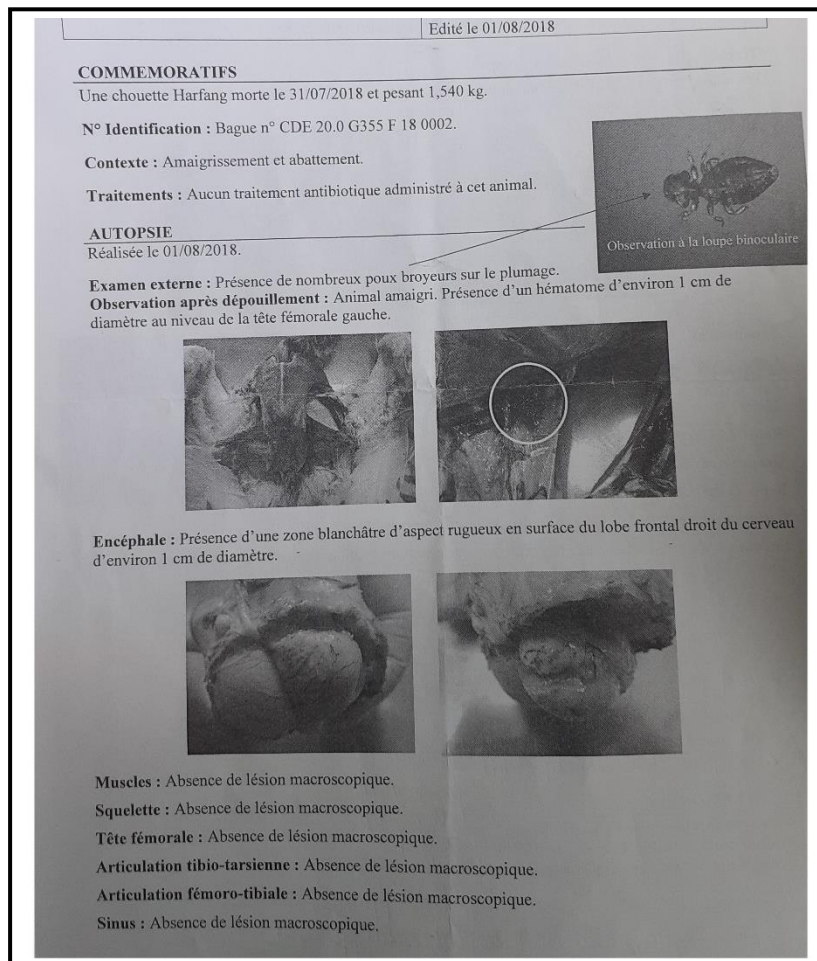


Figure 36 : Rapport d'autopsie d'une chouette harfang positive en RT-PCR USUV @VetDiagnostics

b. *Le questionnaire*

Jusqu'en 2019, les prélèvements n'étaient envoyés qu'avec un rapport d'autopsie, de contenu variable. En 2019, j'ai rédigé un nouveau formulaire spécifique pour l'histologie, qui a été envoyé à tous les parcs zoologiques participants au projet (**annexe 3**), puis étendu aux fauconniers et aux centres de soins. Ce formulaire avait pour objectif de standardiser les commémoratifs et l'anamnèse et de préciser les descriptions macroscopiques. Il a été rédigé

à partir du travail de Valentine Fantuzzi, qui a réalisé un questionnaire axé sur les facteurs de risques d'atteinte par USUV dans les parcs zoologiques (Fantuzzi, 2021).

La première partie de ce questionnaire reprenait directement les questions rédigées par Valentine Fantuzzi, et qui permettait d'évaluer la probabilité d'atteinte par USUV selon les conditions de détention de l'animal.

La deuxième partie, le volet B, était propre à l'histologie. Il reprenait les conditions de la mort de l'animal, les résultats de l'autopsie, la description précise des symptômes ante-mortem, les traitements mis en place et les potentiels autres animaux atteints. L'objectif était de fournir au vétérinaire responsable de l'autopsie une trame avec tous les éléments indispensables à l'analyse complète du cas.

B. Traitement des données

Malgré une proposition de soumission de cette thèse au comité d'éthique de VetAgroSup, ce dernier a estimé que ce travail ne relevait pas de son évaluation, les données traitées étant des données professionnelles.

1) Recueil des rapports d'autopsie et des questionnaires

Les rapports d'autopsie étaient riches en informations, notamment sur les conditions de décès de l'animal, les signes précurseurs de sa mort, son âge, son sexe, et son espèce, utilisés pour étudier les facteurs influençant la pathogénie du virus Usutu.

Les lésions macroscopiques observées à l'autopsie et référencées dans les rapports ont été confrontées aux lésions observées à l'histologie.

2) Préparation des lames histologiques et lecture

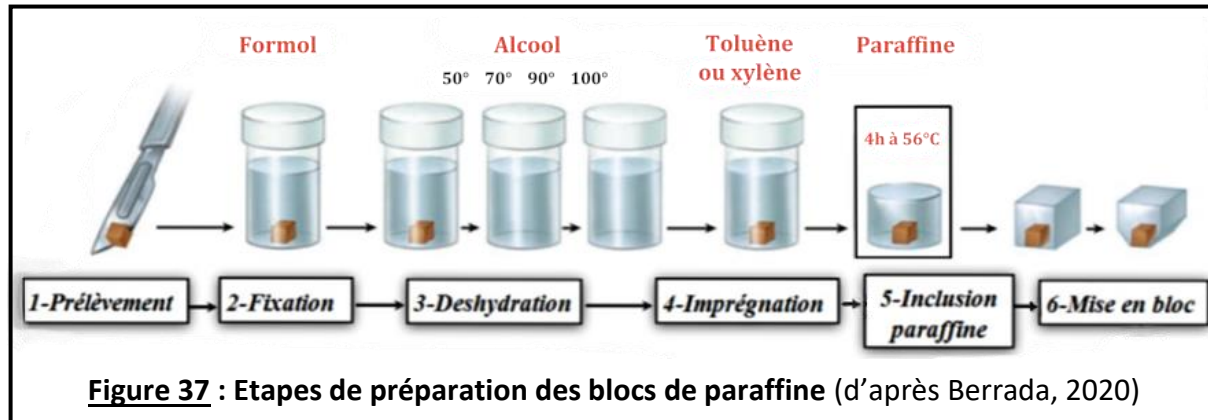
a. Réalisation des blocs de paraffine

Les prélèvements plongés dans le formol ont été reçus au laboratoire VetDiagnostics. Les lames ont été préparées selon le protocole standard de réalisation de lames en coloration éosine-hémalum (HE).

La recoupe des échantillons consiste en une section selon le plan le plus intéressant et le plus représentatif de chaque prélèvement, afin d'obtenir une taille adéquate une fois sur lame. Cette étape s'effectue sous hotte, avec des gants et des lunettes, afin de limiter l'exposition de l'opérateur aux vapeurs de formol. Une fois recoupés, les prélèvements ont été placés dans des cassettes d'histologie et immergés dans des solutions d'alcool de plus en plus concentrées (alcool dilué de 50° à 100°), afin de les déshydrater. Cette étape permet d'éliminer l'eau des tissus et favorise donc l'étape d'inclusion en paraffine, car elle est hydrophobe.

Une fois la déshydratation effectuée, les prélèvements ont été imprégnés dans du toluène, afin d'éliminer les traces d'alcool de l'étape précédente.

Enfin, les prélèvements sont inclus en paraffine, une résine blanche inerte, sous forme de blocs regroupant plusieurs organes. Ces blocs permettent de rigidifier les tissus et d'obtenir des coupes régulières et de très faible épaisseur (**figure 37**).



b. Réalisation des lames histologiques

Les blocs ont été coupés au microtome, afin d'obtenir des coupes de 4 μm . Les rubans de coupes ainsi obtenus ont été étalés sur lame et fixés par chauffage. La paraffine possède un point de fusion entre 56 à 58°C, ce qui permet de déparaffiner facilement les coupes. Les prélèvements déparaffinés ont été réhydratés, dans des bains d'alcool de concentration décroissante, afin d'éliminer la paraffine intracellulaire, puis réhydratés avec de l'eau distillée. Les lames histologiques ont été colorées avec une coloration hémalum-éosine (HE), couramment utilisée dans les études histologiques d'USUV (Weissenböck et al., 2003).

c. Lecture des lames

L'observation des lames a été réalisée par microscopie optique au laboratoire d'anatomopathologie vétérinaire VetDiagnostics, par le Dr Karin Lemberger. Lors de mon entrée dans le groupe de travail sur le virus Usutu, j'ai reçu une formation d'une semaine à la lecture des lames histologiques d'oiseau, au laboratoire VetDiagnostics, en août 2019. Comme explicité précédemment, les tissus d'oiseaux présentent de nombreuses spécificités, qu'il convient de connaître pour interpréter correctement les lésions. Cette formation m'a permis de me familiariser avec les lames obtenues avant août 2019 et avec les lésions spécifiques du virus.

Les lésions histologiques visualisées par le Dr Lemberger, notifiées dans la base de données de VetDiagnostics et par moi-même, lors de la relecture des lames, sont répertoriées par organe dans un tableau reprenant chaque cas afin d'en simplifier l'analyse.

3) Traitement des résultats des analyses virologiques

Les résultats de RT-PCR USUV ont permis de corréler les lésions observées et l'infection effective par le virus Usutu et ainsi de se concentrer sur les cas positifs. Leur traitement visait également à identifier la souche à l'œuvre pour chaque cas.

Afin de pouvoir comparer ces résultats, les numéros d'identification (ARKS et SAGIR) présents dans les rapports d'autopsie ont été comparés à ceux retrouvés dans les résultats de RT-PCR, transmis par l'ANSES d'Alfort. En cas d'absence de numéros concordants, je me suis aidée de l'espèce atteinte et de la date de mort afin de remonter au résultat, lorsque cela était possible.

4) Réalisation des immunomarquages

L'immunohistochimie (IHC) repose sur la reconnaissance d'un antigène d'intérêt par un anticorps primaire et à la détection de ce complexe antigène-anticorps, grâce à un marqueur. Le marqueur est visualisable à l'histologie par réaction entre l'enzyme fixée sur l'anticorps et un substrat, qui produit une certaine couleur sur la lame. Cette méthode permet de déduire la localisation d'un agent pathogène porteur de l'antigène, ici le virus Usutu. L'objectif était ainsi de confronter les lésions observées à l'histologie et la localisation du virus au sein des tissus. Les immunomarquages ont été réalisés en décembre 2021 au BioPôle de l'Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, sous la supervision d'Hélène Huet, et ont été intégralement financés par l'AFVPZ.

a. Les critères de sélection des cas

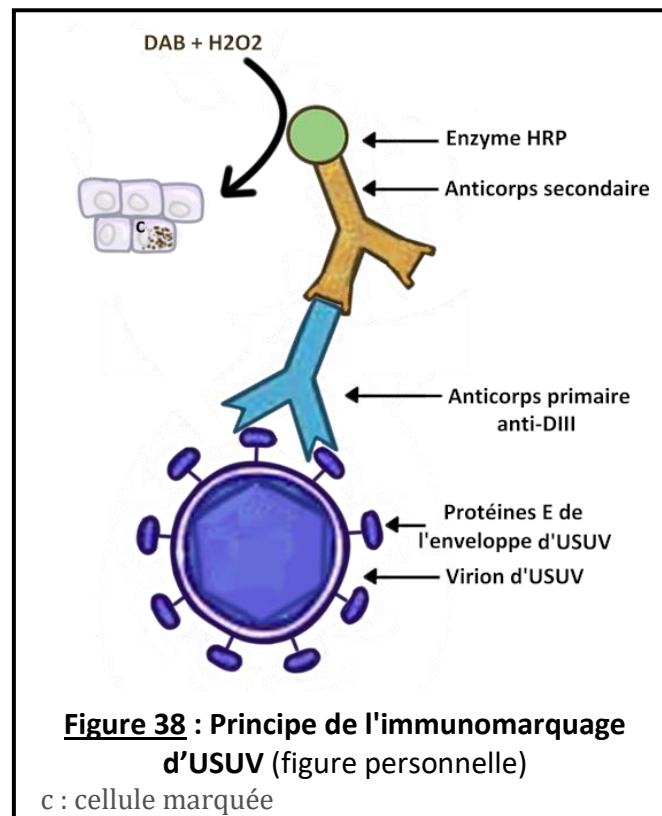
Seize cas peu autolysés ont été sélectionnés (**annexe 4**) en raison de leurs lésions caractéristiques, dont le marquage par le virus confirmerait la corrélation virus-lésion, de leur espèce (espèce non connue pour être sensible au virus, dont le résultat positif en RT-PCR USUV est étonnant), ou de leur année de décès (antérieur à 2015).

b. Les marqueurs

Les immuno-marquages ont été réalisés avec des **anticorps polyclonaux de lapin anti-DIII** comme anticorps primaires. Les anticorps primaires ont été obtenus en injectant directement l'antigène à des lapins, en récupérant leur sérum et en le purifiant. Le domaine DIII correspond à un domaine de l'ARN d'USUV codant pour des protéines de son enveloppe. Les anticorps anti-DIII ciblent donc les sites antigéniques des protéines E de l'enveloppe codés par la séquence DIII.

Ce marqueur a été développé par l'Anses de Maisons-Alfort, dans le cadre du projet Usutu, afin de déterminer si les lésions observées à l'histologie étaient bien dues à USUV.

Sur ces anticorps primaires, viennent se fixer des anticorps secondaires universels de lapin, dirigés contre les régions constantes des anticorps primaires de cette espèce. Ces anticorps sont rattachés à une enzyme, la peroxydase de raifort (HRP), qui en présence d'un chromophore, la **diaminobenzidine (DAB)**, forme un dépôt coloré marron. Lorsque le virus est présent dans un tissu, les anticorps primaires se fixent à son enveloppe. Les anticorps secondaires marquent alors la position de ces derniers, grâce à la réaction entre l'enzyme HRP et le chromophore diaminobenzidine, qui colore les tissus marqués en brun (**figure 38**). C'est donc une méthode de révélation indirecte.



Ces anticorps ont été testés en 2018 à différentes concentrations sur des cultures de cellules de primates (cellules Vero) infectées expérimentalement par le virus Usutu.

c. Les témoins

Afin de tester la méthode et le marqueur, des témoins positifs ont été réalisés. Ces témoins sont des **cellules « Vero »**, cellules rénales de singe vert (*Chlorocebus sabaues*), qui ont été modifiées et infectées expérimentalement par le virus Usutu, afin de déterminer si le marqueur se fixait bien aux cellules infectées, et si le cycle de marquage était correctement effectué.

Pour chaque lame soumise à l'immunomarquage, on effectue une lame témoin sans anticorps primaires, afin de vérifier la présence ou non d'artéfacts de coloration.

d. Le protocole

Chaque bloc de paraffine a été coupé au microtome. Les prélèvements ont ensuite été détendus au bain marie et montés sur lame. Deux lames ont été réalisées par bloc, une destinée à recevoir les anticorps primaires dilués au 1/5000^e et une autre pour le témoin négatif, qui nous a permis d'interpréter les marquages observés sur les lames.

Toutes les lames ont reçu des anticorps secondaires.

Les lames sont contre-colorées par de l'hématoxyline, afin de renforcer le contraste avec la coloration brunâtre du chromophore.

Toutes les étapes à partir du déparaffinage ont été réalisées automatiquement grâce au Discovery XT de VENTANA (**figure 39**), selon le protocole en **annexe 5**. Cet appareil permet d'introduire successivement les différents réactifs et tampons nécessaires pour enlever la paraffine, fixer et colorer les tissus sur les lames, de façon standardisée. Seuls les anticorps primaires et secondaires ont été déposés manuellement.

Ce protocole permet d'obtenir une lame colorée en bleu, faiblement contrastée et un marquage brun.

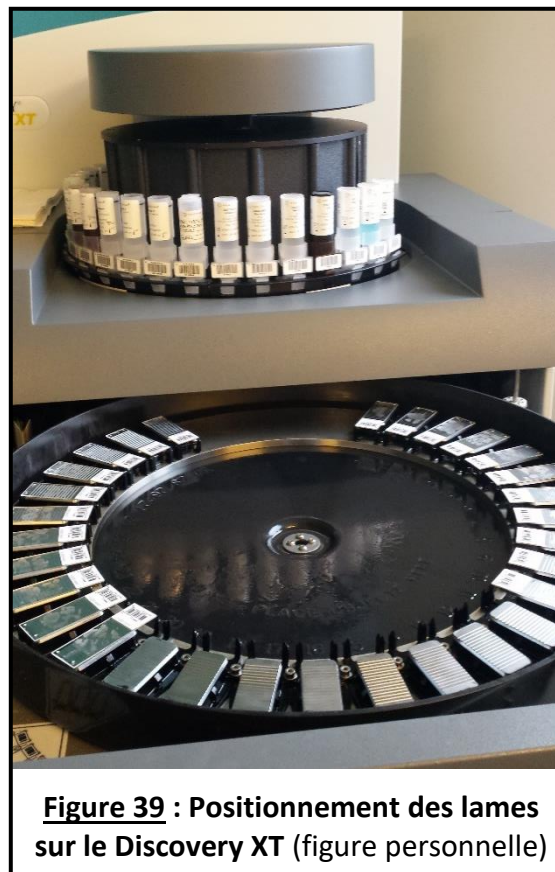


Figure 39 : Positionnement des lames sur le Discovery XT (figure personnelle)

C. Analyse et interprétation des données

1) Analyse des observations histologiques

a. Inventaire des lésions

Suite à l'observation des lames histologiques colorées en HE, les résultats ont été notés par cas dans un tableau Excel, en distinguant les cas positifs en RT-PCR USUV de ceux non testés. J'ai ainsi pu calculer les pourcentages d'atteinte par organe.

Les lésions ont été gradées selon leur sévérité de discrète à sévère, en reprenant l'exemple du scoring utilisé lors de l'étude de Giglia et collaborateurs (Giglia et al., 2021). Une lésion était évaluée comme discrète quand elle ne représentait qu'un foyer isolé de petite taille, ou quand les lésions étaient multifocales mais peu visibles. Les lésions modérées correspondaient à toute lésion isolée de grande taille ou multifocale dont la visualisation était récurrente. La structure du tissu était alors localement modifiée. Les lésions sévères correspondaient quant à elles aux lésions très marquées, étendues ou présentes dans une grande portion du tissu et à l'origine d'une forte désorganisation du tissu.

b. Confrontation des lésions histologiques microscopiques aux lésions macroscopiques d'autopsie

Parmi les lésions rencontrées à l'autopsie, les lésions les plus significatives ont été sélectionnées, afin d'être comparées aux lésions observées à l'histologie. Je me suis ainsi concentrée sur l'hépatomégalie et la splénomégalie, lésions fréquemment rencontrées dans la littérature (Chvala et al., 2004 ; Giglia et al., 2021 ; Steinmetz et al., 2011), ainsi que sur l'hétérogénéité du parenchyme splénique et hépatique. Pour chaque cas présentant une hépatomégalie ou une splénomégalie, j'ai confronté la présence ou non de lésions de nécrose, d'inflammation et de lymphocytolyse splénique ou hépatique. Ces résultats ont été analysés par un test statistique de Fisher, à l'aide du logiciel XL stat .

c. Identification des lésions utiles pour le diagnostic d'USUV

Les lésions identifiées ont été confrontées à celles retrouvées dans la littérature, et à partir de la pathogénèse du virus, les lésions spécifiques de l'atteinte par le virus Usutu ont été distinguées de celles reliées à une comorbidité ou à un état de débilitation. L'absence de visualisation directe d'autres organismes pathogènes (bactéries, parasites ou éléments fongiques) ou de lésions virales caractéristiques d'autres virus qu'USUV autour des lésions a été considérée ici comme un critère d'exclusion de l'implication d'un autre pathogène dans l'apparition des lésions.

d. Détermination des organes d'intérêt

Suite à l'identification des lésions d'intérêt pour le diagnostic d'USUV, j'ai établi un score lésionnel par organe. Ce score est comptabilisé en additionnant, chez les cas retenus, l'intensité des lésions obtenues par organe et en faisant la moyenne des scores individuels. Chaque lésion étant notée entre 0 et 3, d'absent à sévère. Le score obtenu a permis d'évaluer les organes à privilégier lors de l'étude histologique à visée diagnostique, grâce à un test bilatéral de Kruskal-Wallis, à l'aide du logiciel XL stat.

e. Etude histologique des cas non testés en RT-PCR USUV

En application de l'étude des lésions d'intérêt au diagnostic d'USUV, une analyse des lésions objectivées sur les cas anciens ou plus récents non accompagnés de résultats virologiques a été menée. Il s'agissait de déterminer si l'atteinte par le virus Usutu était probable ou non en tenant compte des résultats précédents. Cette analyse a été complétée par l'analyse immunohistochimique d'un cas.

2) Evaluation des facteurs de risque

La comparaison des lésions visualisées et des données fournies par les rapports d'autopsie a permis d'évaluer l'influence de l'âge, du sexe et de l'espèce de l'hôte sur l'atteinte.

Les examens virologiques menés suite aux RT-PCR USUV en temps réel ont permis de déterminer la souche impliquée pour certains cas. L'objectif était ici de vérifier si la souche virale avait un effet sur les lésions observées à l'histologie, et notamment sur le pattern lésionnel.

Pour ce faire, les facteurs étudiés ont été comparés entre eux à partir de la prévalence des lésions obtenues dans chaque organe selon le facteur. Afin de faciliter l'analyse, les lésions ont été arbitrairement regroupées par tropisme. Ont ainsi été distinguées les hépato-splénites accompagnées d'encéphalites, les hépato-splénites simples, les splénites et les encéphalites isolées. De plus, la présence ou non d'une atteinte cardiaque a été mise en relation avec les différents facteurs étudiés. Etaient considérés comme hépatite, les cas présentant une nécrose hépatique, une inflammation ou la présence de thrombi de fibrine. De même les splénites ont été définies par une nécrose splénique, une inflammation ou une lymphocytolyse. Les cas décrits comme à tropisme neurologique présentaient une nécrose neuronale, une neuronophagie ou une inflammation mononucléée. Enfin l'atteinte cardiaque a été considérée comme la présence seule ou conjointe d'une nécrose myocardique et ou d'une inflammation.

Pour l'évaluation de l'influence de l'âge sur le tropisme, les âges des différents cas étant très variés, des classes d'âges ont été établies, selon l'espérance de vie moyenne de chaque espèce (Austad et al., 2017). Ainsi la chouette lapone (*Strix nebulosa*) a une espérance de vie moyenne de 16 ans en captivité, elle était donc considérée comme jeune avant un an, adulte de un à neuf ans et âgée au-delà de neuf ans, de même que pour la chouette harfang (*Bubo scandiacus*) (espérance de vie moyenne de 15 ans) et le grand tétras (*Tetrao urogallus*) (espérance de vie moyenne de 18 ans). Chez les merles noirs (*Turdus merula*) une longévité de 21 ans et plus a fréquemment été observée. Or, la détermination de l'âge étant approximative chez les merles dans cette étude, s'agissant d'individus sauvages. Ils sont donc classés uniquement en jeunes (lorsque leurs organes reproducteurs sont peu développés) et adultes (tous les individus mâturs).

L'analyse statistique a été réalisée grâce à la loi binomiale, par un test de Fisher sur les effectifs des tropismes observés pour chaque facteur.

Une régression linéaire logistique a été réalisée afin de déterminer l'existence ou non de facteurs confondants, qui pourraient limiter l'observation de corrélations pertinentes.

3) Analyse des résultats d'immunomarquage

Une fois les immunomarquages réalisées, les lames ont été observées au microscope optique et comparées à leur témoin sans anticorps primaires, ainsi qu'à la lame histologique en

coloration HE correspondante. La localisation des lésions a ainsi pu être confrontée à la localisation des différents immunomarquages. Chaque lame a ainsi été intégralement analysée et le marquage des lésions présentes a été évalué. J'ai réalisé la lecture des résultats, avec l'aide d'Hélène Huet (à l'origine des premiers tests de l'anticorps secondaire) et du Dr Karin Lemberger. Les lames ont été en partie relues par le Dr Grégory Jouvion du laboratoire d'anatomopathologie de l'école vétérinaire de Maisons-Alfort.

Les résultats ont été recueillis dans un tableau Excel afin d'en faciliter le traitement. Les organes étudiés étaient les mêmes qu'en histologie, à savoir la rate, le foie, le cerveau, les poumons, le cœur et les reins.

Chaque organe était évalué selon la présence ou non de marquage, son interprétabilité et son intensité. Les résultats étaient donc classés selon qu'ils étaient positifs faiblement ou fortement marqués, avec un marquage bien circonscrit et visualisable au sein du cytoplasme des cellules, douteux si le marquage était étendu et non clairement délimité au sein du cytoplasme, ou négatifs.

L'objectif était double : **confirmer la présence du virus à proximité des lésions imputées à USUV** à la fois chez des individus positifs en RT-PCR et en histologie, et chez un cas non testé présentant des lésions compatibles, mais également **déterminer les organes dans lesquels l'immunomarquage est le plus intéressant**, le plus interprétable. Je me suis aidée d'un scoring des marquages, de fonctionnement similaire à celui utilisé lors de l'analyse histologique et ne tenant compte que des marquages clairement identifiables, non classés comme douteux. Un test d'indépendance du χ^2 a été réalisé pour évaluer la corrélation entre la présence des lésions histologiques et les immunomarquages, dans l'ensemble des organes d'abord, puis selon la lésion et l'organe étudié. Un test statistique de Fisher (les effectifs étant parfois trop faible pour réaliser un test d'indépendance) a été réalisé pour évaluer si certains organes présentent un intérêt supérieur à d'autres dans l'immunomarquage des lésions supposées être dues à USUV.

III/ Résultats

Malgré le nombre de cas très importants prélevés au cours de l'épizootie de 2018, et les cas qui étaient prévus pour 2019, les cas de mortalité ont été très rares depuis septembre 2018. Si bien que le questionnaire et le protocole prévu pour les nouveaux cas n'ont été que très peu utilisés. J'ai distingué les résultats de l'analyse histologique des oiseaux positifs en RT-PCR USUV et ceux obtenus sur les oiseaux non testés en RT-PCR.

A. Résultats de l'étude des rapports d'autopsie

1) Anamnèse

a. Sexe

Les rapports d'autopsie apportaient une information sur le sexe de 18 oiseaux sur les 30 analysés en histologie. Parmi ceux-ci, six mâles et sept femelles sur 19 chouettes laponnes (*Strix nebulosa*), un mâle et une femelle sur six merles noirs (*Turdus merula*), un mâle chouette de l'Oural (*Strix uralensis*) et une femelle chouette de Tengmalm (*Aegolius funereus*).

b. Age

Parmi les 30 cas positifs en RT-PCR USUV étudiés, six étaient juvéniles (dont deux chouettes laponnes de quatre mois et une chouette lapone d'un an), six avaient entre deux et six ans (oiseaux adultes, dont deux chouettes laponnes de deux ans, une chouette lapone de quatre ans, une chouette de Tengmalm de neuf ans, un grand tétras de cinq ans) et deux étaient âgés de plus de dix ans (dont une chouette lapone de dix ans et une chouette de l'Oural de 15,5 ans).

2) Symptômes ante-mortem

Sur 43 cas au total, les symptômes étaient notifiés dans les rapports pour seulement 11 cas, sans que l'on puisse savoir si ceux-ci n'ont pas été reportés ou si les animaux n'en avaient simplement pas présenté. Parmi ceux reportés, une chouette de l'Oural (*Strix uralensis*) avec une perte d'équilibre, une chouette harfang (*Bubo scandiacus*) avec amaigrissement et abattement, une chouette lapone (*Strix nebulosa*) en détresse respiratoire, une chouette lapone en abattement et anorexie pendant trois jours, une chouette lapone en anorexie, abattement, insuffisance hépatique et troubles neurologique depuis une semaine, une chouette lapone en amaurose et une autre anémiée, deux chouettes laponnes anorexiques mortes en 24h, des signes neurologiques chez une chouette lapone, abattement et mort en une heure chez une chouette lapone et enfin une chouette à lunettes (*Pulsatrix perspicillata*) avec abattement et anorexie depuis plusieurs jours, suivis d'une anémie et de convulsions (**tableau III**). A ces cas-ci peuvent être ajoutés une mort subite chez une chouette effraie (*Tyto alba*) et une chouette lapone.

Tableau III : Symptômes objectivés en ante-mortem issus des rapports d'autopsie

Espèce	Nombre (n=11)	Symptômes
Chouette de l'Oural / lapone / à lunettes	4	Troubles neurologiques
Chouette lapone / à lunettes	5	Anorexie
Chouette harfang / lapone / à lunettes	7	Abattement
Chouette harfang	1	Amaigrissement
Chouette lapone	1	Détresse respiratoire
Chouette lapone	1	Insuffisance hépatique
Chouette lapone / à lunettes	2	Anémie

3) Lésions macroscopiques

Parmi les 30 cas testés en RT-PCR, les résultats d'autopsie n'étaient disponibles que pour 25 d'entre eux. Une hépatomégalie légère à marquée a été observée chez 50 % des chouettes laponnes (9/18) et des merles (2/4), ainsi qu'une splénomégalie légère à marquée chez 22 % des chouettes laponnes (4/18) et chez 75 % des merles noirs (3/4) (**tableau IV**).

Tableau IV : Lésions macroscopiques obtenues d'après les rapports d'autopsie chez les oiseaux avec une RT-PCR USUV positive

	Lésions macroscopiques	Nombre (n=25)	Espèces
FOIE	Hépatomégalie	9/18	Chouette lapone
		2/4	Merle noir
	Parenchyme hépatique hétérogène	3/18	Chouette lapone
	Congestion hépatique	2/4	Merle noir
RATE		3/18	Chouette lapone
	Splénomégalie	4/18	Chouette lapone
		3/4	Merle noir
CERVEAU	Parenchyme splénique hétérogène	3/18	Chouette lapone
	Congestion cérébrale	3/18	Chouette lapone
		1/2	Chouette harfang
CŒUR	Opacification des méninges	1/2	Chouette harfang
	Epanchement péricardique	1/18	Chouette lapone
	Péricardite fibrineuse	1/2	Chouette harfang
POUMONS	Pétéchies cardiaques	1/18	Chouette lapone
	Congestion pulmonaire	4/18	Chouette lapone
	Nodules pulmonaires	1/2	Chouette harfang
		1/1	Chouette de l'Oural
	Aucune lésion macroscopique visible	1/1	Chouette de Tengmalm
	3/18	Chouette lapone	

Parmi les 13 cas non testés en RT-PCR USUV, seulement quatre étaient accompagnées de données à l'autopsie (**tableau V**), les autres n'ayant soit pas été retrouvés dans les archives, soit non renseignés sur la fiche d'accompagnement des prélèvements.

Tableau V : Lésions macroscopiques obtenues d'après les rapports d'autopsie chez les oiseaux non testés en RT-PCR USUV

	Lésions macroscopiques	Nombre (n=4)	Espèces
FOIE	Hépatomégalie	1/2	Chouette lapone
		1/1	Chouette à lunettes
	Pétéchies hépatiques	1/1	Chouette effraie
RATE	Congestion splénique	1/1	Chouette effraie
CŒUR	Epanchement péricardique	1/1	Chouette effraie
POUMONS	Stase pulmonaire	1/2	Chouette lapone
	Aucune lésion macroscopique visible	1/2	Chouette lapone

B. Résultats de l'étude des prélèvements histologiques

Les lésions histologiques des 30 cas positifs au virus Usutu en analyse virologique et ceux non testés en RT-PCR USUV ont été répertoriées par organe. Plusieurs cas étaient incomplets (20/30 et 10/13) et de nombreux prélèvements d'organes étaient manquants (**annexe 6 et 7**). De plus, certains prélèvements étaient autolysés (3/30), ce qui a compliqué leur analyse en histologie. L'ensemble de ces résultats est disponible en **annexe 8**. Par la suite, le nombre d'organes autolysés sera présenté mais le dénombrement des lésions s'effectuera en s'affranchissant des organes autolysés.

1) Lésions histologiques spléniques

Parmi les 30 cas étudiés en RT-PCR USUV, 26 prélèvements de rate nous ont été soumis, dont deux prélèvements de merles noirs autolysés (que nous ne compterons donc pas par la suite). Le pattern lésionnel observé sur ces rates était dominé par une nécrose vasculaire et péri-vasculaire (**figure 40**) modérée (1/24 prélèvements) à sévère (18/24) présente sous forme de larges plages de nécrose multifocales à coalescentes, avec nécrose fibrinoïde concomitante de la paroi vasculaire, chez la chouette lapone, le merle noir et la chouette harfang. Cette nécrose était fréquemment associée à une lymphocytolyse sévère (17/24) et à une inflammation mononucléée ou hétérophilique (10/24). Sur les 24 prélèvements spléniques non autolysés, 23 présentaient des lésions et un prélèvement ne présentait aucune lésion (**tableau VI-A**). Une hémossidérose splénique a été observée chez deux cas, un merle noir et une chouette de l'Oural.

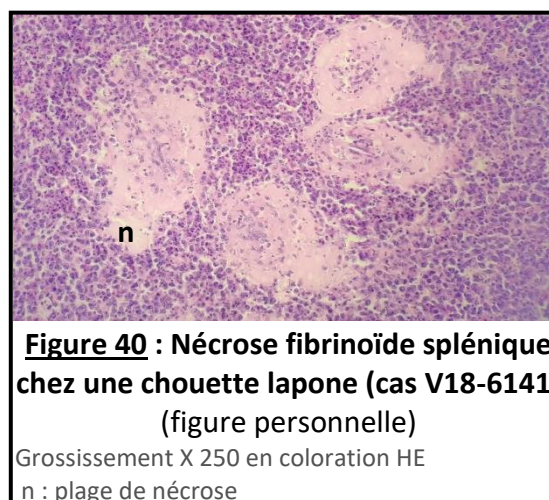


Tableau VI : Lésions spléniques des oiseaux positifs en RT-PCR USUV (A) et non testés (B)

A	Lésions microscopiques Sévérité des lésions	Chouette lapone			Merle noir			Chouette de l'Oural		
		.+.	.++.	.+++.	.+.	.++.	.+++.	.+.	.++.	.+++.
	Nécrose fibrinoïde splénique			14/16.	1/6.	3/6.				
	Congestion splénique					1/6.				
	Inflammation splénique (mononucléés ou hétérophiles)	1/16.	6/16.		1/6.					
	Lymphocytolyse splénique			13/16.		2/6.				
	Hémossidérose			1/16.						1/1.
	Autolyse splénique				1/6.	1/6.				
	Hyperplasie lymphoïde									1/1.

A	Lésions microscopiques	Chouette de Tengmalm			Chouette harfang			Grand tétras		
	Sévérité des lésions	.+++
	Nécrose fibrinoïde splénique						1/1.			
	Congestion splénique									1/1.
	Inflammation splénique									
	(mononucléés ou hétérophiles)			1/1.		1/1.				
	Lymphocytolyse splénique						1/1.			1/1.
	Hémosidérose									
	Autolyse splénique									
	Hyperplasie lymphoïde			1/1.						

B	Lésions microscopiques	Chouette lapone			Merle noir			Chouette effraie			Chouette à lunettes		
	Sévérité des lésions	.++++
	Nécrose fibrinoïde splénique			3/6.						1/1.			
	Inflammation splénique	1/6.	1/6.									0/1.	
	Lymphocytolyse splénique			1/6.									
	Hyperplasie des cellules réticuloendothéliales			2/6.									
	Autolyse splénique				1/1.								

+ : lésion discrète ; ++ : lésion modérée ; +++ : lésion sévère

Dans chaque case, le premier nombre correspond au nombre de prélèvements de rate présentant la lésion, et le second le nombre total de prélèvements de rate de cette espèce présentés à l'analyse.

La principale lésion objectivée à l'histologie pour les cas non testés en RT-PCR (**tableau VI-B**) est une nécrose fibrinoïde splénique marquée (4/8). Un échantillon splénique de merle noir était autolysé et ininterprétable.

2) Lésions histologiques hépatiques

Sur les 29 prélèvements de foie soumis à l'analyse (**tableau VII-A**), 25 présentaient des lésions et deux étaient autolysés. Une nécrose fibrinoïde hépatocytaire multifocale discrète à sévère (14/27), a été observée, ainsi qu'une congestion hépatique sévère (22/27). Des thrombi de fibrine de petite taille (7/27) à modérés (6/27) étaient visibles dans certains capillaires sinusoides. Un merle noir présentait des œufs de trématodes au sein de ses canaux biliaires, à l'origine d'une hyperplasie de l'épithélium (V18-6396).

Tableau VII : Lésions hépatiques des oiseaux positifs en RT-PCR USUV (A) et non-testés (B)

A	Lésions microscopiques	Chouette lapone			Merle noir			Chouette de l'Oural			Chouette harfang			Grand tétras		
	Sévérité des lésions	.+++++
	Nécrose fibrinoïde hépatique	1/19.	6/19.	3/19.			3/6.						1/2.			
	Congestion hépatique			16/19.			3/6.		0/1.				2/2.			1/1.
	Lipidose hépatique		1/19.													
	Thrombi de fibrine	6/19.	5/19.				1/6.						1/2.			
	Autolyse hépatique						1/6.	1/6.								
	Hémosidérose hépatique															1/1.

B	Lésions microscopiques	Chouette lapone			Merle noir			Chouette effraie			Chouette à lunettes		
	Sévérité des lésions	.++++
	Nécrose fibrinoïde hépatique	1/10.	5/10.	4/10.			1/1.			1/1.			
	Congestion hépatique			7/10.									1/1.
	Thrombi de fibrine		1/10.										
	Inflammation hépatique	2/10.	2/10.				1/1.			1/1.			
	Hémosidérose hépatique												1/1.
	Hyperplasie des cellules réticuloendothéliales		1/10.										

+ : lésion discrète ; ++ : lésion modérée ; +++ : lésion sévère

Dans chaque case, le premier nombre correspond au nombre de prélèvements de foie présentant la lésion, et le second le nombre total de prélèvements de foie de cette espèce présentés à l'analyse

Les prélèvements d'oiseaux non testés en RT-PCR (**tableau VII-B**) avaient un parenchyme hépatique présentant multifocalement des foyers de nécrose (**figure 41**) avec débris cellulaires (12/13) à distribution aléatoire et périvasculaire, une congestion sévère (8/13) et une inflammation discrète à marquée (6/13) avec accumulation de monocytes (**figure 42**) ou d'hétérophiles et de macrophages.

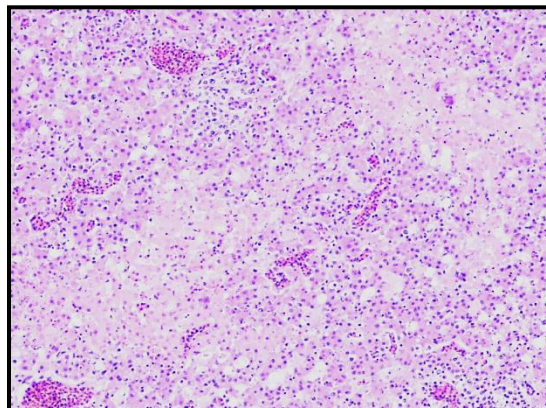


Figure 41 : Nécrose fibrinoïde hépatocyttaire chez une chouette lapone @ K. Lemberger

Grossissement X100 en coloration HE

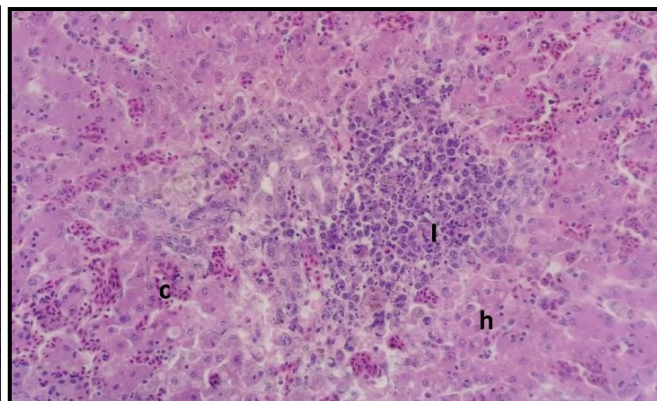


Figure 42 : Inflammation mononucléée hépatique chez une chouette lapone (cas V18-6141) (figure personnelle)

Grossissement X 250 en coloration HE

l : infiltration de mononucléés ; h : hépatocyte ; c : capillaires sinusoides

3) Lésions histologiques cérébrales

Aucun prélèvement de cerveau de chouette de l'Oural ou de chouette de Tengmalm n'a été soumis à analyse. Parmi les 25 prélèvements de cerveau d'oiseaux positifs en RT-PCR (**tableau VIII-A**), 18 présentaient des lésions et deux étaient autolysés. Le parenchyme cérébral montrait des lésions de polioencéphalite au niveau du pédoncule cérébelleux (2/23) ou de la substance grise (8/23), caractérisées principalement par une neuronophagie discrète (1/23) à modérée (8/23) avec infiltration de lymphocytes, macrophages et plasmocytes formant des nodules denses (10/23) (**figure 43**), et une congestion cérébrale marquée (8/23).

Tableau VIII : Lésions cérébrales des oiseaux positifs en RT-PCR USUV (A) et non testés (B)

A	Lésions microscopiques Sévérité des lésions	Chouette lapone			Merle noir			Chouette harfang			Grand tétaras			
		.+	.++	.+++	.+	.++	.+++	.+	.++	.+++	.+	.++	.+++	
	Nécrose fibrinoïde cérébrale	2/16.												
	Neuronophagie	1/16.	4/16.			3/6.			1/2.					
	Infiltrat nodulaire de mononucléés	4/16.			2/16.			2/6.			1/6.			
	Congestion				6/16.						1/2.			
	Autolyse du cerveau				1/6.			1/6.						

B	Lésions microscopiques Sévérité des lésions	Chouette lapone			Merle noir			Chouette à lunettes		
		.+	.++	.+++	.+	.++	.+++	.+	.++	.+++
	Infiltration mononucléée périvasculaire	1/4.	2/4.		0/1.			0/1.		
	Neuronophagie	1/4.								

+ : lésion discrète ; ++ : lésion modérée ; +++ : lésion sévère

Dans chaque case, le premier nombre correspond au nombre de prélèvements de cerveau présentant la lésion, et le second le nombre total de prélèvements de cerveau de cette espèce présentés à l'analyse.

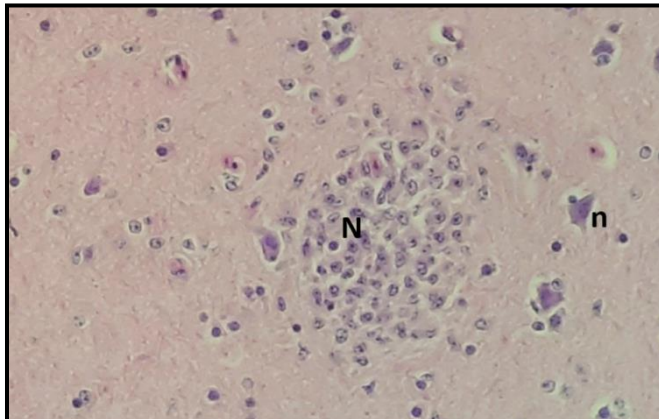


Figure 43 : Nodule microglial chez une chouette lapone (cas V18-6141) (figure personnelle)
 N : nodule microgliale ; n : corps cellulaire d'un neurone

Chez les cas non testés en RT-PCR (**tableau VIII-B**), les lésions cérébrales étaient plus frustes avec une inflammation mononucléée périvasculaire observée chez seulement trois chouettes laponnes sur 10. Aucun prélèvement de cerveau de chouette effraie n'a été étudié.

4) Lésions histologiques pulmonaires

Sur 29 prélèvements pulmonaires d'oiseaux positifs en RT-PCR USUV, 27 présentaient des lésions et un prélèvement était autolysé. Les prélèvements pulmonaires non autolysés (**tableau IX**) présentaient parfois une nécrose du parenchyme pulmonaire (9/28) discrète à sévère, associée à un épaississement interstitiel, une congestion pulmonaire modérée (3/28) à sévère (12/28) et des dépôts de fibrine (17/28) sous forme de thrombi de fibrine, accompagnés de débris caryorectiques. Un prélèvement de chouette harfang et deux de chouettes laponnes présentaient une nécrose pulmonaire centrée sur des hyphes fongiques, compatible avec une aspergillose et associée à un large granulome des sacs aériens périphériques pour une des deux chouettes laponnes (V16-6232).

Tableau IX : Lésions pulmonaires des oiseaux positifs en RT-PCR USUV (A) et non testés (B)

A	Lésions microscopiques Sévérité des lésions	Chouette lapone			Merle noir			Chouette de l'Oural		
		.+.	.++.	.+++.	.+.	.++.	.+++.	.+.	.++.	.+++.
	Nécrose pulmonaire	2/19.	5/19.	1/19.						
	Congestion pulmonaire			8/19.			4/5.			
	Œdème pulmonaire			1/19.			3/5.			
	Thrombi de fibrine	2/19.	10/19.	4/19.						
	Hyphes fongiques	1/19.	1/19.						0/1.	
	Granulome pulmonaire			1/19.						
	Autolyse pulmonaire						1/5.			

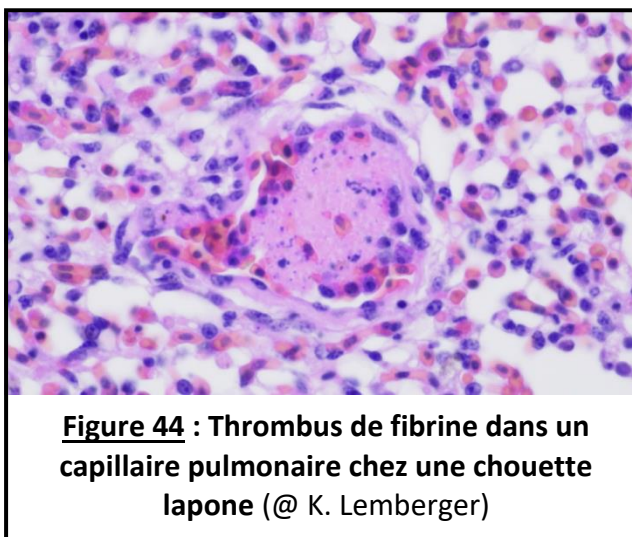
A	Lésions microscopiques Sévérité des lésions	Chouette de Tengmalm			Chouette harfang			Grand tétras		
		.+.	.++.	.+++.	.+.	.++.	.+++.	.+.	.++.	.+++.
	Nécrose pulmonaire					1/2.				
	Congestion pulmonaire		1/1.			1/2.			1/1.	
	Œdème pulmonaire									
	Thrombi de fibrine					1/2.				
	Œdème pulmonaire									
	Granulome pulmonaire						1/2.			
	Autolyse pulmonaire									

Lésions microscopiques B Sévérité des lésions	Chouette lapone			Chouette effraie			Chouette à lunettes		
	.+.	.++.	.+++.	.+.	.++.	.+++.	.+.	.++.	.+++.
Nécrose pulmonaire	1/9.	1/9.	2/9.						
Congestion pulmonaire			8/9.		1/1.			1/1.	
Thrombi de fibrine	2/9.	1/9.	2/9.						
Œdème pulmonaire		1/9.	2/9.		1/1.				

+ : lésion légère ; ++ : lésion modérée ; +++ : lésion sévère

Dans chaque case, le premier nombre correspond au nombre de prélèvements de poumon présentant la lésion, et le second le nombre total de prélèvements de poumon de cette espèce présentés à l'analyse

Les prélèvements pulmonaires de cas non testés en RT-PCR (**tableau IX-B**) montrent principalement une nécrose du parenchyme pulmonaire, voire vasculaire (4/11), une congestion sévère (10/11) et des thrombi de fibrine (5/11) (**figure 44**). Aucun prélèvement pulmonaire de merle noir non testé en RT-PCR n'a été étudié.



5) Lésions histologiques cardiaques

Sur 24 prélèvements de cœurs d'oiseaux positifs en RT-PCR USUV et présentés en analyse, neuf présentaient des lésions (**tableau X**). Ces cas présentaient focalement quelques zones de dégénérescence voire une nécrose du myocarde (4/24), ou une myocardite avec infiltration lymphoplasmocytaire (5/24) discrète à modérée (**figure 45**). De la fibrose myocardique (2/24) et de l'athérosclérose aortique (2/24) ont également été observées. Aucun prélèvement cardiaque de merle noir non testé en RT-PCR n'a été étudié.

Tableau X : Lésions cardiaques des oiseaux positifs en RT-PCR USUV (A) et non testés (B)

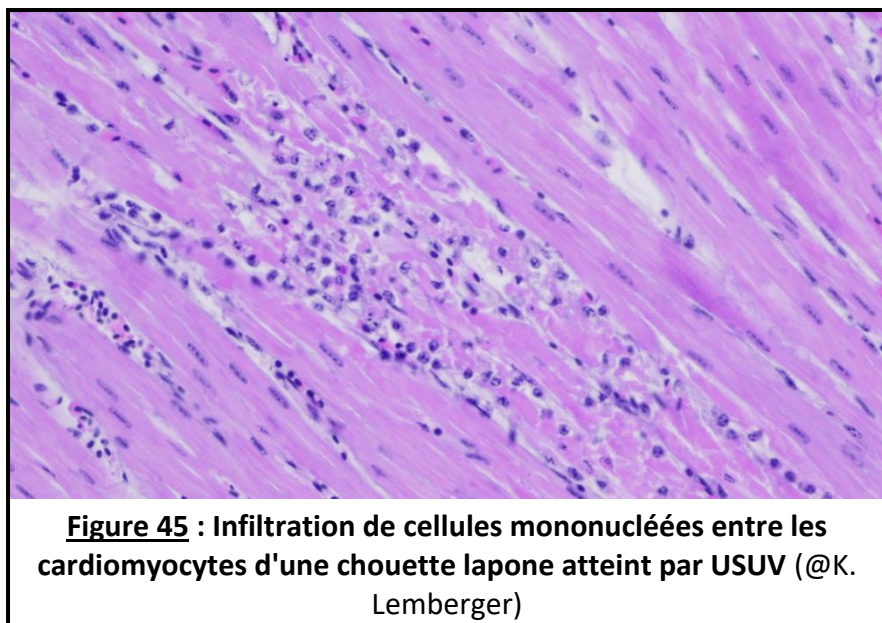
A Lésions microscopiques Sévérité des lésions	Chouette lapone			Merle noir		
	.+.	.++.	.+++.	.+.	.++.	.+++.
Inflammation mononucléée myocardique	2/16.				2/5.	
Nécrose myocardique	3/16.			1/5.		
Athérosclérose aortique						
Fibrose myocardique	1/16.	1/16.				

A Lésions microscopiques Sévérité des lésions	Chouette de l'Oural			Chouette de Tengmalm			Grand tétaras		
	.+.	.++.	.+++.	.+.	.++.	.+++.	.+.	.++.	.+++.
Inflammation mononucléée myocardique				1/1.					
Nécrose myocardique							0/1.		
Athérosclérose aortique			1/1.	1/1.					
Fibrose myocardique									

B	Lésions microscopiques	Chouette lapone			Chouette effraie			Chouette à lunettes		
	Sévérité des lésions	.+.	.++.	.+++.	.+.	.++.	.+++.	.+.	.++.	.+++.
	Nécrose myocardique						1/1.			1/1.
	Inflammation mononucléée myocardique		0/7.			1/1.		1/1.		
	Thrombi de fibrine				1/1.					

+ : lésion légère ; ++ : lésion modérée ; +++ : lésion sévère

Dans chaque case, le premier nombre correspond au nombre de prélèvements de cœur présentant la lésion, et le second le nombre total de prélèvements de cœur de cette espèce présentés à l'analyse



Parmi neuf cas non testés en analyses virologiques, deux seulement présentaient des lésions.

6) Lésions histologiques rénales

Sur 24 prélèvements de reins, 16 présentaient une congestion modérée à sévère (**tableau XI-A**). Un seul cas présentait une inflammation mononucléée rénale.

Tableau XI : Lésions rénales et systémique des oiseaux positifs en RT-PCR USUV (A) et non testés (B)

A	Lésions microscopiques	Chouette lapone			Merle noir			Chouette de l'Oural		
	Sévérité des lésions	.+.	.++.	.+++.	.+.	.++.	.+++.	.+.	.++.	.+++.
	Congestion rénale		2/17.	9/17.		1/2.	1/2.			0/1.
	Inflammation mononucléée rénale	1/17.								

A	Lésions microscopiques	Chouette de Tengmalm			Chouette harfang			Grand tétras		
	Sévérité des lésions	.+.	.++.	.+++.	.+.	.++.	.+++.	.+.	.++.	.+++.
	Congestion rénale			1/1.			1/2.			1/1.
	Inflammation mononucléée rénale									

B	Lésions microscopiques	Chouette lapone			Chouette effraie			Chouette à lunettes		
	Sévérité des lésions	.+.	.++.	.+++.	.+.	.++.	.+++.	.+.	.++.	.+++.
	Congestion rénale			6/10.						1/1.
	Nécrose tubulaire		2/10.		1/1.				1/1.	
	Inflammation mononucléée				1/1.					1/1.

+ : lésion légère ; ++ : lésion modérée ; +++ : lésion sévère

Dans chaque case, le premier nombre correspond au nombre de prélèvements de reins présentant la lésion, et le second le nombre total de chaque prélèvements des espèces présentés à l'analyse

Parmi les cas non testés en RT-PCR, 10 prélèvements de reins sur 12 montraient des lésions, principalement de la nécrose tubulaire discrète (1/12) à modérée (3/12) et de la congestion (7/12) (**tableau XI-B**). Aucun prélèvement rénal de merle noir non testé en RT-PCR n'a été soumis à analyse.

C. Résultats virologiques

Les numéros d'identification des oiseaux accompagnant les prélèvements étaient multiples (numéro Arks, numéro de transpondeur électronique, de bague, numéros SAGIR et références laboratoires) et ne correspondaient pas toujours à ceux utilisés par l'ANSES pour identifier leurs échantillons. Parmi les 30 prélèvements étudiés en histologie et envoyés en analyse virologique, seulement 17 ont pu être reliés à leur résultat virologique, malgré le contact des vétérinaires de parcs zoologiques, pour avoir la liste des numéros d'identification des oiseaux concernés, et le contact de l'Anses. Seuls quatre résultats virologiques étaient accompagnés d'un typage de la souche d'USUV (**tableau XII**).

Tableau XII : Résultats de l'identification des souches virales suite à la RT-PCR-USUV

Numéro de cas	Espèce	Lignée virale, souche virale
V15-4179	Chouette lapone	Europe 3 , KX601691 (99% d'homologie avec KY114797 Allemagne 2016)
V17-6504	Merle noir	Africa 3 (99% d'homologie avec KY114798 Allemagne 2016)
V18-6857	Chouette lapone	Europe 3
V18-6426	Chouette lapone	Europe 3

D. Résultats de l'immunohistochimie

A l'immunohistochimie, un bruit de fond a été fréquemment objectivé, ce qui a rendu difficile la lecture des marquages. Seul le marquage spécifique est intéressant, les résultats présentés par la suite ne correspondent donc qu'à des marquages intra-cellulaires bien circonscrits.

Le signal viral se distribuait principalement (marquage faible à fort) dans la rate (8/14), dans le cerveau (6/12) et dans le cœur (3/12). Les reins ne présentaient aucun marquage (**tableau XIII**).

Tableau XIII : Résultats des immunomarquages par organe et par espèce

Espèces Organes	Chouette lapone (n=11)				Merle noir (n=3)				Chouette harfang (n=1)				Grand téttras (n=1)			
	.-.	./-.	+..	++..	.-.	./-.	+..	++..	.-.	./-.	+..	++..	.-.	./-.	+..	++..
Rate	1/9.	1/9.	1/9.	6/9.	1/3.	2/3.					1/1.				1/1.	
Foie	3/11.	7/11.		1/11.	1/3.	2/3.				1/1.					1/1.	
Cerveau	5/9.	4/9.	1/9.	2/9.			1/3.	2/3.								
Poumons	4/10.	4/10.		2/10.	2/2.					1/1.					1/1.	
Cœur	6/9.	1/9.	2/9.		1/2.		1/2.								1/1.	
Reins	9/9.				2/2.										1/1.	

- : absence de marquage IHC ; +/- : marquage IHC douteux ; + : marquage présent mais faible ; ++ : fort marquage IHC

Dans chaque case, le premier nombre correspond au nombre de prélèvements par organe et le second le nombre total de prélèvements de chaque espèce présentée à l'analyse

n = le nombre total de cas testés en IHC de chaque espèce

Les marquages les plus nets et les mieux délimités ont été retrouvés dans les corps cellulaires des neurones (**figure 46**), dans le cerveau, chez la chouette lapone et le merle noir. La rate présentait également des motifs de marquage très reconnaissables, périvasculaires (**figure 47**). Le foie en revanche présentait souvent des marquages douteux (11/16), en raison d'un bruit de fond plus important que dans les autres organes (**figure 48**). Au sein du myocarde, les marquages étaient focaux, assez bien délimités et localisés dans le cytoplasme des cardiomyocytes.

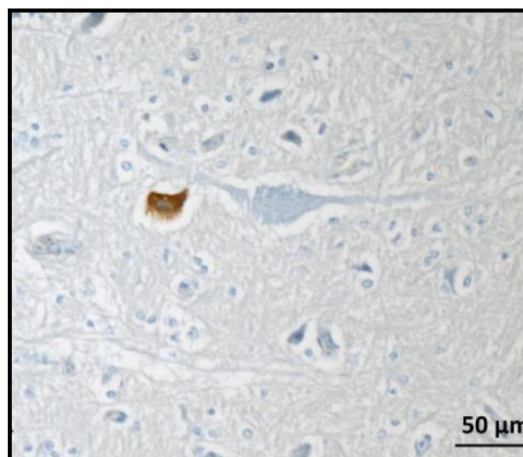


Figure 46 : Neurone marqué positivement en IHC chez une chouette lapone positive en RT-PCR USUV (V17-6504) @ H. Huet

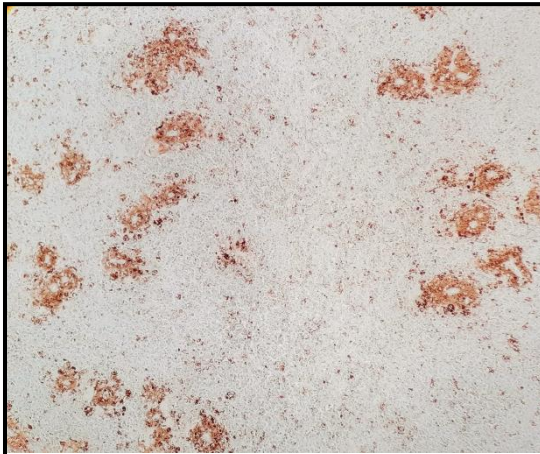


Figure 47 : Marquage IHC positif sur la rate (X100) d'une chouette lapone (figure personnelle)

Les anticorps de marquage se concentrent densément en région périvasculaire

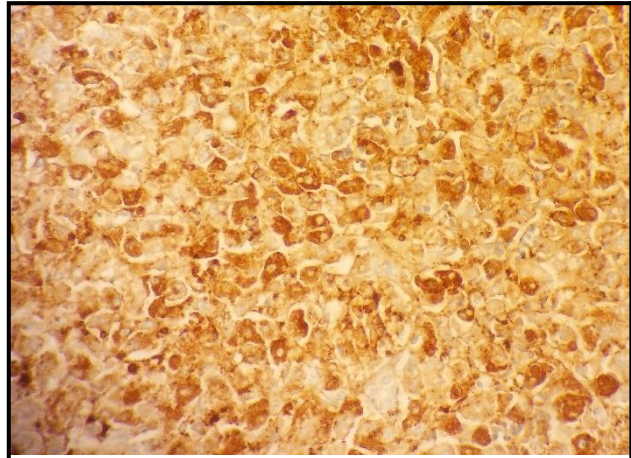


Figure 48 : Marquage IHC hépatique (X250) douteux chez une chouette lapone (figure personnelle)

Le marquage semble contenu au sein du cytoplasme des hépatocytes mais est diffus dans tout le parenchyme hépatique

Le cas le plus ancien présentant un immunomarquage est une chouette lapone de 2013 (V13-4691) non testée en RT-PCR USUV, avec un marquage positif dans le foie et un marquage correspondant à des foyers circonscrits de nécrose myocardique.

E. Analyse des résultats

1) Les patterns lésionnels et le tropisme d'organe

Afin de simplifier l'analyse des résultats, les lésions utiles au diagnostic d'USUV ont été sélectionnées. Ces lésions ne pouvaient être agoniques, reliées à un état de débilitation, ou à un autre agent pathogène, voire présentaient une forte similarité par rapport à ce qui est décrit dans la littérature.

a. Mise en relation des lésions histologiques et macroscopiques

L'analyse des lésions macroscopiques s'est concentrée sur l'étude de la corrélation entre splénomégalie, hétérogénéité du parenchyme splénique, hépatomégalie, hétérogénéité du parenchyme hépatique et la présence de lésions compatibles à l'histologie, pour les cas positifs en RT-PCR USUV. Seuls 23 cas, possédant à la fois des prélèvements de foie ainsi que des rapports d'autopsie complets, ont été retenus. Pour la rate, la corrélation lésions histologiques-lésions macroscopiques a été étudiée chez 20 cas, comportant à la fois un prélèvement splénique et des rapports d'autopsie complets. Ainsi, la présence d'un

hépatomégalie a été confrontée à celle d'une hépatite à l'histologie, de même que la présence d'une splénomégalie avec celle d'une splénite à l'histologie (**Tableau XIV**).

Tableau XIV : Tableau de contingence entre les lésions macroscopiques à l'autopsie et microscopiques à l'histologie pour la rate (A) et le foie (B) des cas positifs en RT-PCR USUV

A	n=20	I+	I-
	L+		7
L-		11	0

B	n=23	I+	I-
	L+		8
L-		6	5

I+ : lésions histologiques compatibles à une atteinte par USUV ; I- : Absence de lésions histologiques compatibles

L+ : lésions compatibles à l'autopsie ; L- : Absence de lésions compatibles à l'autopsie

L'analyse statistique des résultats avec un test exact de Fisher n'a pas permis pas de montrer un lien significatif entre les lésions macroscopiques et histologiques, que ce soit pour les lésions spléniques ou hépatiques (p-value respectives de 0.189 et 0.680). La comparaison de la présence de lésions histologiques et macroscopiques a cependant permis, à l'aide d'un test Q de Cochran, de démontrer qu'il y avait significativement plus de lésions spléniques à l'histologie que de lésions spléniques à l'autopsie (p-value de 0.032).

b. Sélection des lésions d'intérêt dans le diagnostic d'USUV

La nécrose fibrinoïde, qu'elle soit splénique, hépatique, cérébrale, cardiaque, rénale ou pulmonaire, est la lésion qui revient le plus fréquemment dans les études précédentes (Bakonyi et al., 2007 ; Chvala et al., 2004 ; Giglia et al., 2021 ; Manarolla et al., 2010 ; Steinmetz et al., 2011), et semble particulièrement intéressante pour le diagnostic d'USUV. Son diagnostic étiologique comprend d'autres atteintes virales, l'herpesvirose et l'adénovirose notamment, et une infection fulminante bactérienne, la chlamydiose ou la pasteurellose en particulier chez les oiseaux.

De même l'infection par USUV a été fréquemment corrélée à la présence d'une inflammation mononucléée, avec principalement des lymphocytes et macrophages, et parfois associés à des plasmocytes ou à des hétérophiles dans les organes cibles, et en position péri-vasculaire. Cette infiltration est directement liée à la pathogenèse du virus, qui infecte en premier lieu les tissus périvasculaires et déclenche un afflux de cellules mononucléées et d'hétérophiles sur le site de l'infection. C'est ainsi qu'une lymphocytolyse modérée à sévère peut s'observer dans la rate, consécutivement à l'apoptose que le virus provoque (comme exposé en partie bibliographique IIB5).

La gliose et la neuronophagie sont des lésions cérébrales indicatrices d'une inflammation de l'encéphale, et parfois associées à une atteinte virale à tropisme neurologique. Elles apparaissent donc comme très intéressantes pour le diagnostic d'USUV, en compagnie de lésions spléniques et hépatiques.

La présence de thrombi de fibrine, bien que non mentionnée dans les études précédentes, a ici été considérée comme intéressante pour l'étude d'USUV. Cependant, au sein du foie et de la rate, des microthrombi se forment fréquemment lors d'atteinte virale aiguë, mais aussi d'insuffisance rénale, de processus septique ou encore de coagulation intravasculaire disséminée. Ainsi, leur observation, même si elle conforte une suspicion d'atteinte par USUV, est non diagnostique à elle seule.

La congestion a été une lésion fréquemment rencontrée au cours de l'étude, et ce dans le foie (76 % de congestion), les reins (70 % de congestion), les poumons (52 % de congestion), le cerveau (32 % de congestion) et la rate (8 % de congestion), toutes espèces confondues, avec un total de 60 % de congestion multicentrique (plus de deux organes sévèrement congestionnés ou plus de trois organes modérément congestionnés). Dans la littérature ont été retrouvées les congestions cérébrales (Höfle et al., 2013), spléniques (68 % de congestion splénique dans l'étude de Chvala de 2004), pulmonaires (83 % dans l'étude de Chvala de 2004) et la congestion multi-organique (Höfle et al., 2013). Cependant, la congestion est une lésion peu spécifique, souvent agonique. Chez les cas atteints par USUV elle est considérée comme consécutive à l'atteinte multicentrique provoquée par le virus Usutu, elle n'a donc pas été retenue comme une lésion intéressante pour l'étude de ce dernier en histologie.

C'est également le cas des lésions d'hémossidérose splénique et de la lipidose hépatique, ainsi que de la fibrose myocardique, qui sont des lésions liées à un état de débilitation, possiblement consécutif à l'atteinte par le virus Usutu, mais non directement dû à son action. L'athérosclérose aortique est induite par des conditions de captivité ou une alimentation inadaptée (notamment une cholestérolémie trop élevée) et est fréquemment observée chez les oiseaux de proie captifs (Fowler, 1986).

Les lésions d'intérêt retenues pour l'établissement du score lésionnel sont donc la nécrose fibrinoïde et l'inflammation (mononucléée ou hétérophilique) quel que soit l'organe, la lymphocytolyse splénique et la neuronophagie. Pour le foie, j'ai également tenu compte de la formation de thrombi de fibrine dans les vaisseaux.

c. Sélection des cas intéressants pour l'étude

Parmi les cas positifs en RT-PCR, certains présentaient des lésions compatibles avec certaines affections autres qu'USUV, voire présentaient à l'observation au microscope des agents pathogènes susceptibles d'entraîner la mort de l'individu. Ces derniers ont donc été écartés du scoring, afin de ne conserver que les cas dont les lésions étaient très probablement dues à USUV. Ainsi, deux merles noirs (V15-4179 et V18-6244) ont été retirés de l'étude pour cause d'autolyse, une chouette de l'Oural (V16-6233) ne présentant qu'une splénite a été écartée car les lésions pouvaient être imputées au parasitisme sanguin relevé dans ses commémoratifs et une chouette lapone (V18-6640) a été retirée du scoring car ses lésions hépatiques et pulmonaires étaient très probablement dues à une aspergillose pulmonaire. Ainsi, seulement 26 cas ont été utilisés pour l'établissement du score lésionnel.

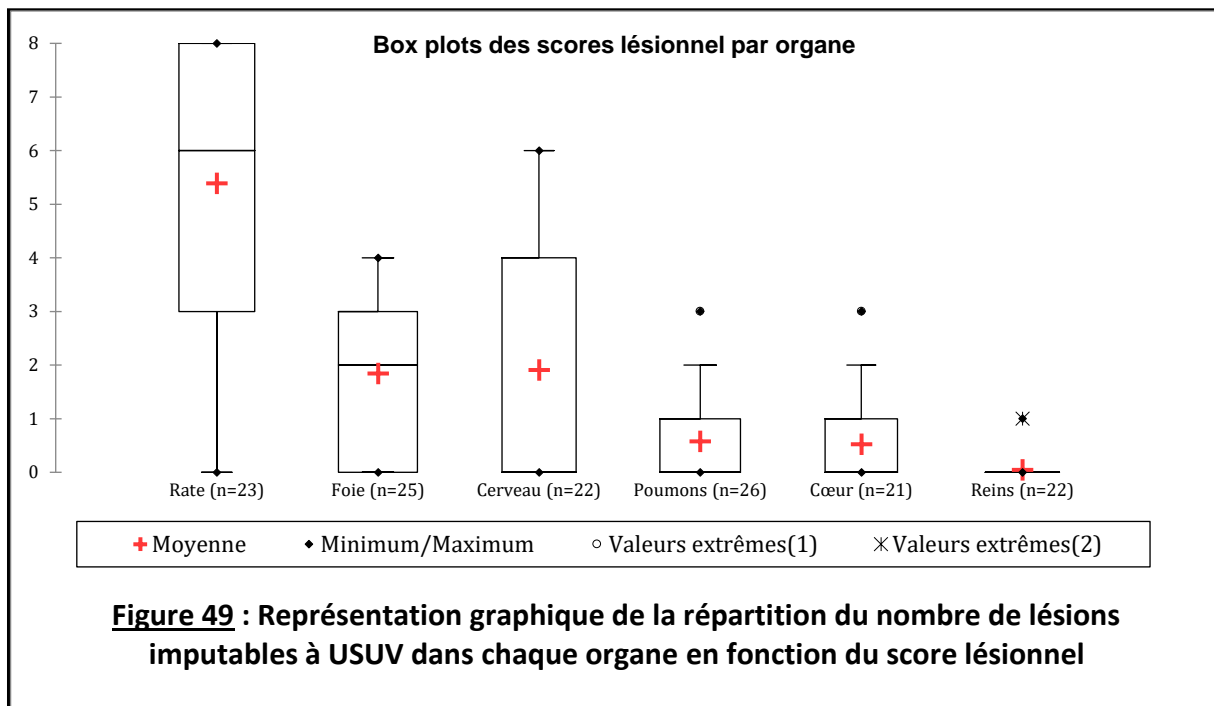
d. Détermination des organes d'intérêt dans le diagnostic d'USUV

Chaque organe a été étudié afin d'établir un score lésionnel (addition du nombre de lésions compatibles avec USUV selon la sévérité). Les lésions d'intérêt sélectionnées précédemment (voir III E1b) étaient ainsi comptabilisés selon leur sévérité dans chaque organe pour chaque cas.

Pour chaque organe, le score lésionnel de chaque individu a été additionné, afin d'obtenir un score d'atteinte caractéristique par organe (**annexe 9**).

Un test de Kruskal-Wallis a montré qu'il existait un lien entre l'organe étudié et le score lésionnel ($p\text{-value} < 0.0001$). Ceci a montré que certains organes présentaient significativement plus de lésions que d'autres.

Ainsi, en tenant compte des lésions majoritaires lors d'atteinte par USUV, les organes les plus fréquemment atteints par des lésions caractéristiques étaient par ordre d'importance la rate, le foie, le cerveau, le cœur et les poumons (**figure 49**).



L'étude de la rate en particulier, présentait des lésions compatibles avec USUV significativement plus nombreuses que les autres organes (par test statistique de Dunn et test exact de Fischer, $p\text{-value}$ très inférieure à 0.05). Une myocardite nécrosante ou une pneumonie nécrotique étaient moins souvent objectivées, et si elles venaient compléter l'expression lésionnelle de l'atteinte par USUV, elles ne semblaient pas indispensables au diagnostic de ce dernier. Je me suis donc concentrée sur l'étude du foie, de la rate et du cerveau pour l'étude de l'influence de différents facteurs sur le tropisme d'organe.

e. Etablissement des différents profils lésionnels

A l'issue de l'étude des lésions visibles à l'histologie, différents tropismes lésionnels se distinguaient : atteinte hépato-splénique, atteinte hépato-splénique et cérébrale ou splénite seule. L'analyse a été compliquée par l'absence des organes de certains cas, qui n'a donc pas permis de conclure pour nombre de cas. Afin de simplifier l'analyse, nous nous sommes intéressés principalement au foie, à la rate et au cerveau. Les poumons étant marqués de lésions peu spécifiques, et parfois combinées à une aspergillose ou à une infection bactérienne et les reins ne faisant l'objet que de rares lésions, ils ont été volontairement écartés de l'établissement des profils lésionnels. De même, seulement 35 % des cas positifs en RT-PCR USUV pour lesquels un prélèvement de cœur a été présenté en histologie montraient des signes d'atteinte myocardique (inflammation ou nécrose myocardique). Ceci suggérait que l'atteinte myocardique était occasionnelle. Nous ne nous sommes donc pas intéressés au cœur pour l'étude des facteurs.

Ainsi, parmi nos cas, ont été étudiés les hépato-splénites sans encéphalite associée (quatre cas « complets », dont tous les organes principaux avaient été soumis à analyse), les hépato-splénites associées à une encéphalite (huit cas complets), les splénites seules (chez quatre cas) et les encéphalites seules (chez deux chouettes laponnes présentant des symptômes neurologiques et une atteinte de l'état général). Deux cas ne présentaient aucune lésion marquée dans les principaux organes. Cette absence d'atteinte pourrait être liée avec une atteinte suraiguë, pour laquelle le délai entre le début de l'infection et la mort est trop court pour le développement des lésions histologiques. De plus, dans la littérature (Steinmetz et al., 2011) 49 % seulement des oiseaux présentaient des lésions typiques d'USUV à l'histologie, d'où l'établissement d'une sixième catégorie d'atteinte, exempte de lésions caractéristiques à l'histologie.

2) Etude des cas anciens non testés par analyse virologique

Les lésions des cas non envoyés en RT-PCR USUV ont été étudiées et confrontées à celles observées chez les cas positifs en RT-PCR USUV, précédemment étudiés.

Un cas a été écarté d'emblée, car l'analyse histologique de cette chouette lapone (V15-4198) présentant une hépatite montrait la présence de corps d'inclusions intra-lésionnels hépatiques, compatibles avec une adénovirose ou avec une herpesvirose.

Le cas V16-5261 présentait des lésions pulmonaires compatibles avec une bronchopneumonie et des lésions hépatiques emboliques. L'absence de soumission de la rate et de l'encéphale à l'analyse histologique a rendu l'interprétation très ardue, le cas n'a donc pas pu être relié à l'infection par le virus Usutu.

De même la chouette à lunettes (*Pulsatrix perspicillata*) V18-3195 ne présentait aucune lésion splénique, hépatique ou cérébrale, seulement une myocardite. L'atteinte du cœur seul n'a pas

été observée au cours de cette étude, mais une atteinte particulière chez cette espèce ne peut être écartée, la littérature n’offrant aucun exemple similaire.

Les autres cas ont été étudiés selon leurs scores lésionnels obtenus sur les organes précédemment sélectionnés (rate, foie, cœur, poumons et cerveau).

Selon les scores lésionnels précédemment établis, les cas présentant les scores spléniques les plus élevés avaient plus de chance d’être morts des suites d’une infection par USUV, la moyenne du scoring des cas positifs étant de 5,4. Nous en avons conclu que la chouette lapone V18-6371, qui présentait un score splénique de 8, avec une inflammation modérée, ainsi qu’une lymphocytolyse et une nécrose sévère, mais également une hépatite et une encéphalite avec neuronophagie et inflammation mononucléée, donc compatibles avec USUV, était probablement infectée par le virus Usutu, et qu’il s’agissait d’une cause probable de sa mort.

Ainsi, en combinant les cas présentant des scores élevés pour la rate, le foie et l’encéphale, et ne présentant pas d’étiologie plus évidente pour les lésions, la chouette lapone V15-4176 et la chouette effraie V18-3926, dont les cerveaux n’ont pas été soumis, semblaient susceptibles d’être mortes des suites d’une infection par USUV. Or la chouette effraie 18-3926 a été retrouvée morte mi-mai, en dehors de la période d’infectiosité connue du virus, et n’avait donc que peu de chance d’être morte des suites du virus.

Afin de rendre les résultats de l’analyse plus lisibles, les cas ont été classés en trois catégories selon leur susceptibilité d’atteinte par USUV (**tableau XVI**) :

Tableau XV : Classement des cas non testés en RT-PCR selon leur susceptibilité d'atteinte par USUV

Forte	Modérée	Faible
V18-06371 (fin août) V13-04691 (fin août)	V13-04644 (fin août) V11-2605 (fin juin) V17-06207 (début septembre, mort rapide) V16-06796 (novembre) V15-04176 (mi-août)	V15-4198 V16-5261 V18-03195 (décès en avril et absence de lésions compatibles) V15-05433 (fin octobre) V18-9073 V18-03926 (mi-mai, mort subite)

Susceptibilité forte : cas présentant des commémoratifs compatibles, une atteinte splénique, hépatique et cérébrale et des lésions fortement compatibles avec une atteinte par USUV dans plus de deux organes

Susceptibilité modérée : atteinte d'au moins deux organes parmi la rate, le foie, l'encéphale, le cœur et les poumons, avec au moins un organe présentant des lésions caractéristiques

Susceptibilité faible : moins de deux organes atteints, absence de lésions compatibles ou cas relié à une autre cause visible, nombre d'organes soumis insuffisant pour conclure, commémoratifs peu compatibles

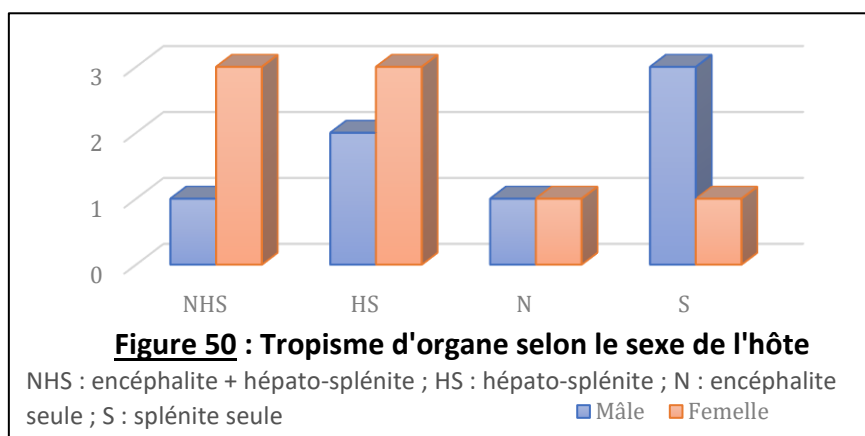
Si l'analyse de ces cas à partir des résultats d'analyse histologique et de leurs commémoratifs a permis d'émettre une suspicion plus ou moins forte d'atteinte par USUV, l'histologie n'est cependant pas suffisante à elle seule et nécessite d'être combinée à des résultats virologiques pour un diagnostic de certitude.

3) Etude des facteurs pouvant influencer le tropisme d'organe

L'objectivation de l'existence d'une certaine variabilité des lésions selon les cas, m'a amenée à m'interroger sur l'existence de facteurs déterminant le type d'atteinte observée.

a. Facteur « sexe »

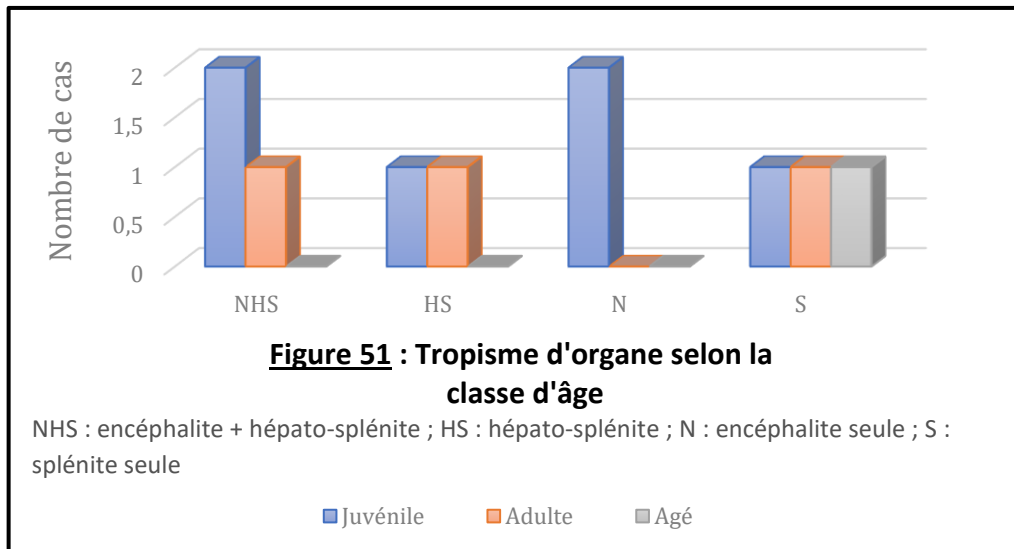
Le type de tropisme d'organe précédemment défini (encéphalite et hépato-splénite, hépato-splénite, encéphalite seule ou splénite seule) a été confronté au sexe de chaque cas, afin de déterminer s'il existe une relation entre le sexe et le tropisme observé (**figure 50**).



Le test de Fisher réalisé sur les résultats n'a pas montré de corrélation significative entre le sexe des individus et le tropisme d'organe observé (p-value = 0.683).

b. Facteur « âge »

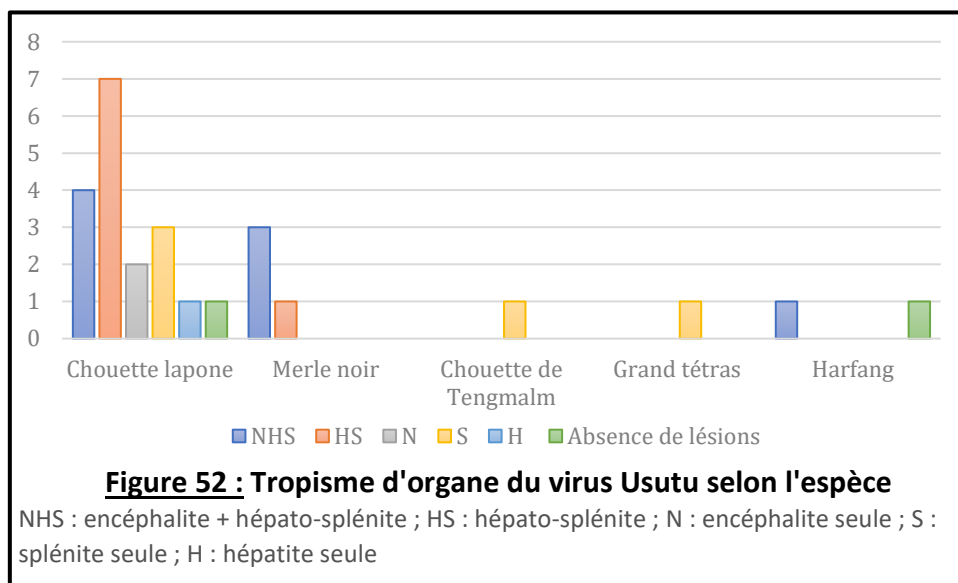
Le tropisme d'organe de chaque cas a été mis en relation avec la classe d'âge de ces derniers, afin d'étudier l'influence de l'âge sur le tropisme d'organe (**figure 51**).



Alors que la plupart des tropismes, hormis les splénites seules, ne semblaient concerner que les jeunes et les adultes, l'étude statistique des résultats a montré que l'âge n'avait pas une influence significative sur le tropisme observé dans cette étude (test de Fisher, p-value = 0.938). Ceci n'était probablement dû qu'à la faible puissance statistique du test (effectifs trop faibles).

c. Facteur « espèce »

Le tropisme a été étudié par espèce afin de déterminer si les organes touchés variaient en fonction de l'espèce atteinte (**figure 52**).



A noter que l'hépatite concernait une chouette lapone dont la rate n'avait pas été soumise, et qui donc pouvait potentiellement présenter des lésions spléniques. De même les deux cas

sans aucune lésion ont été envoyés au laboratoire sans prélèvement de rate associé. Par manque d'individus, l'étude n'a pas montré s'il existait une atteinte spécifique d'un organe plutôt qu'un autre pour chaque espèce (test de Fisher, p-value=0.357).

d. Facteur « souche virale »

Trois souches de lignée Europe 3 et une souche de la lignée Africa 3 ont été mises en évidence au cours de cette étude, avec seulement un cas pour chacune. Parmi ces quatre cas, seulement trois ont été sélectionnés pour l'étude des facteurs, le quatrième (infecté par une souche de lignée Europe 3) ayant été exclu du fait de l'autolyse importante de ses prélèvements. Ces trois cas présentaient un tropisme hépato-splénique, sans atteinte myocardique associée, le cas de lignée Africa 3 n'étant cependant pas accompagné d'un prélèvement de cerveau. Les effectifs présentés étaient en nombre insuffisant pour pouvoir conclure sur le lien entre souche virale et tropisme d'organe.

4) Analyse et interprétation des résultats de l'immunohistochimie

La présence de lésions compatibles au virus Usutu chez des individus positifs en RT-PCR USUV a été étudiée conjointement aux immunomarquages dans de nombreuses études (Chvala et al., 2004 ; Giglia et al., 2021 ; Höfle et al., 2013 ; Steinmetz et al., 2011) afin d'établir une infection par USUV. Nous avons ainsi cherché à confirmer la corrélation entre la localisation du virus dans les tissus par immunomarquage et la présence de lésions histologiques.

a. Analyse statistique et interprétation des résultats d'immunohistochimie

L'objectif de cette analyse statistique était de confirmer que les lésions histologiques de cas positifs en RT-PCR étaient positives par immunomarquages et de vérifier la présence du virus dans les lésions compatibles de cas anciens non testés.

Si l'on étudie globalement l'ensemble des lésions et des marquages associés, le test d'indépendance du χ^2 a montré qu'il existait une corrélation entre ces lésions supposément dues à USUV et les marquages IHC (p-value = 0) (**tableau XVI**).

Tableau XVI : Table de contingence des immunomarquages et des lésions histologiques

	L+	L-
IHC +	15	6
IHC -	15	41

IHC + : présence d'au moins un signal viral distinct au sein d'un organe

IHC - : absence de signal viral distinct au sein d'un organe

L+ : présence dans un organe d'au moins une lésion histologique compatible avec une atteinte pas le virus Usutu (voir partie expérimentale IVA1c)

L - : absence de lésions compatibles avec USUV

Un test de Fisher a mis en évidence que la positivité de l'immunomarquage dans cette étude dépendait de l'organe étudié (p-value = 0.014). La rate présentait significativement plus de marquages corrélés avec des lésions à l'histologie (huit cas immunomarqués sur 14 cas au total, soit 57 %), que les autres organes (1/16 soit 6 % pour le foie, 2/14 soit 14 % pour les poumons et 3/12 soit 17 % pour le cœur), de même que le cerveau (6/13 soit 46 % de lésions compatibles marqués en IHC).

IV/ Discussion

A. Interprétation des résultats et comparaison avec la littérature

1) Les lésions histologiques

a. Confrontation des résultats histologiques et macroscopiques

L'analyse des rapports d'autopsie indiquait une hépatomégalie chez 50 % des merles noirs (2/4) et 50 % des chouettes lapones (9/18) et une splénomégalie chez 22 % (4/18) des chouettes lapones et chez 75 % (3/4) des merles noirs. Ces résultats sont à interpréter avec précaution en raison des faibles effectifs des cas de notre étude. Sur trois études (Chvala et al., 2004 ; Giglia et al., 2021 ; Rijks et al., 2016), le pourcentage d'hépatomégalie chez le merle variait de 55 à 100 % et le pourcentage de splénomégalie variait de 50 à 79 %. Les résultats observés d'une étude à l'autre paraissent donc très variables, malgré des effectifs plus conséquents. Cette variation des lésions macroscopiques au sein d'une même espèce entre les études pourrait être expliquée par des années et des lieux de collecte différents, qui influencent probablement les souches impliquées et l'immunité des oiseaux atteints. Aucune étude n'a pour l'instant exploré ces hypothèses.

La présente étude macroscopique menée chez les Strigiformes et chez les Passeriformes principalement, n'a pas permis de montrer que l'hépatomégalie, la splénomégalie et l'hétérogénéité de leur parenchyme étaient associées à des lésions histologiques compatibles avec une atteinte par le virus Usutu, contrairement aux résultats obtenus dans la littérature au sein de ces groupes (Giglia et al., 2021). Cette différence pourrait s'expliquer par le faible nombre de cas pour lesquels je disposais de rapports d'autopsie et par la multiplicité des opérateurs lors des autopsies.

Si la présence de splénomégalie ou d'hépatomégalie est apparue comme un indice favorable à l'investigation de l'infection par le virus Usutu, elle est associée à d'autres causes, notamment la congestion et la lipidose, qui ont par ailleurs été observées au cours de cette étude, voire d'autres processus infectieux, et ne permet donc de détecter que certains cas.

L'absence d'organomégalie, et de splénomégalie surtout, n'apparaît pas comme suffisante pour écarter l'hypothèse d'une atteinte par USUV.

b. Les lésions histologiques observées

Les nécroses péri-vasculaires modérée à sévère et l'inflammation discrète à marquée qui ont souvent été citées dans les études précédentes (54-82 % selon l'étude) (Bakonyi et al., 2007 ; Chvala et al., 2004 ; Giglia et al., 2021 ; Rijks et al., 2016) ont ici aussi été observées dans 79 % (19/24) des prélèvements de rate, 52 % (14/27) des prélèvements de foie et 32 % (9/28) des prélèvements de poumons. Aux splénites nécrosantes s'ajoutait une lymphocytolyse, tandis que les polioencéphalites présentaient plus rarement des lésions de nécrose (2/23 soit 9 %) et s'accompagnaient plutôt de neuronophagie. Les hépatites nécrosantes et pneumonies s'accompagnaient surtout de thromboses. En effet, les résultats obtenus présentaient la particularité de compter des thrombi de fibrine, absents des études précédentes, et qui obstruaient partiellement ou totalement la lumière vasculaire. Les thrombi de fibrine pouvaient être confondus avec la lyse des hématies, qui survient après la mort de l'animal et est fréquente lorsque le cadavre est autolysé, ils n'ont donc pas été comptabilisés sur les cadavres présentant des traces d'autolyse. Ces thrombi étaient particulièrement abondants dans les poumons des oiseaux de cette étude (61 % de thrombose fibrinoïde toute espèce confondue et plus particulièrement, chez 16/19 des chouettes lapones soit 84 %). Même s'il est intéressant de noter que cette lésion a été fréquemment retrouvée, la thrombose est peu spécifique, car elle peut être consécutive à des lésions endothéliales (comme dans le cas d'USUV), mais aussi à des perturbations du flux sanguin ou à un état d'hypercoagulabilité.

La présence d'une myocardite nécrosante a été plus occasionnelle et se caractérisait par des foyers de nécrose ou d'inflammation bien circonscrits, ce qui est retrouvé dans la littérature. Il a ainsi été décrit des lésions de nécrose myocardique non systématiques et des inflammations lymphoplasmocytaires assez fréquentes (Bakonyi et al., 2007 ; Chvala et al., 2004 ; Manarolla et al., 2010).

Les lésions de nécrose hépatique et de nécrose pulmonaire ont dans cette étude été imputées à USUV. Or d'autres affections, notamment des co-infections fréquemment retrouvées lors d'infection par USUV, peuvent également en être responsables (Rijks et al., 2016). C'est le cas du Plasmodium, parasite sanguin courant chez les oiseaux en captivité et qui altère la circulation sanguine, occasionnant ainsi des nécroses de coagulation dans les tissus (Giglia et al., 2021), bien qu'il n'ait pas été observé ici.

c. Le tropisme d'organe

L'analyse histologique du lot de cas positifs en RT-PCR USUV a révélé une atteinte splénique et hépatique importante, comme décrite dans de nombreuses études, mais a montré une atteinte rénale bien plus limitée (seulement un cas, soit 4 % d'inflammation mononucléée tubulaire et 67 % de congestion rénale) que dans la plupart des descriptions (Chvala et al., 2004 ; Höfle et al., 2013), dans lesquelles ont également été observées de la nécrose rénale (Höfle et al., 2013 ; Steinmetz et al., 2011). Dans notre étude, les reins ne semblaient présenter

que peu d'intérêt pour le diagnostic d'USUV et l'origine de cette faible atteinte rénale par rapport aux autres études reste à déterminer.

Le cerveau, les poumons et le cœur présentaient des lésions similaires, quoique moins fréquentes pour le cœur et moins caractéristiques pour les poumons. L'inflammation myocardique et la nécrose neuronale étaient notamment très variables d'un cas à l'autre, ce qui se retrouve également dans la littérature (Giglia et al., 2021 ; Rijks et al., 2016). Cette variabilité du tropisme nous a incité à étudier l'effet de différents facteurs sur le tropisme observé.

d. Facteurs influençant le tropisme d'organe

Il ressort de cette étude qu'aucun facteur n'a pu démontrer un lien significatif avec le tropisme d'organe observé.

Seules quatre souches ont été déterminées sur les 30 cas analysés en RT-PCR USUV, ce qui a rendu toute interprétation impossible. Ce faible pourcentage se retrouve dans une moindre mesure dans l'étude de Becker et collaborateurs en 2012 (Becker et al., 2012) où le virus n'a pu être isolé que pour 18 cas sur 38 cas au total.

Bien que nous n'ayons pas pu conclure quant à l'existence d'une influence de la souche du virus sur le tropisme d'organe, l'étude de ce facteur pourrait être intéressante avec davantage de cas, un effet de souche ayant déjà été objectivé chez le virus West Nile (Donadieu et al., 2013), proche d'USUV.

Le facteur « espèce » également mériterait davantage d'investigations. En effet, il est apparu que chez certaines espèces réputées très sensibles (Lecollinet et al., 2016), comme le merle noir (*Turdus merula*) ou la chouette lapone (*Strix nebulosa*), l'atteinte était souvent suraiguë et que les lésions pouvaient donc être plus frustes. Chez les chouettes harfangs (*Bubo scandiacus*), des co-infections telles que l'aspergillose ont été observées car l'espèce est moins sensible à USUV. L'étude des deux chouettes harfang de notre étude (V18-6010 et V18-6143) allait dans ce sens, puisque ces chouettes présentaient respectivement des lésions d'aspergillose pulmonaire focale modérée et bactérienne (coccobacilles).

L'espèce hôte pourrait donc influencer la sévérité de l'atteinte par le virus ou la rapidité du décès, ceci reste à démontrer avec de plus grands effectifs.

Concernant le spectre d'hôte, l'atteinte des Strigiformes a été abondamment retrouvée dans la littérature, notamment celle de la chouette lapone (*Strix nebulosa*) et plus rarement de la chouette harfang (*Bubo scandiacus*) (Michel et al., 2018), de même que l'atteinte des Passeriformes comme le merle noir (*Turdus merula*). En revanche, l'atteinte du grand tétras a été beaucoup plus étonnante, cette espèce appartenant à l'ordre des Galliformes, habituellement non symptomatiques des infections par USUV. Cependant, l'immunomarquage n'ayant pas démontré la présence du virus au sein des lésions, l'action d'USUV comme agent causal de la mort de ce cas demeure incertaine.

2) Les immunomarquages

Les résultats des immunomarquages réalisés ont démontré que la rate et le cerveau ont un intérêt supérieur aux autres organes dans l'étude immunohistochimique des lésions dues à USUV, avec des marquages mieux délimités et plus nets.

Contrairement à l'étude de Giglia et al. de 2021, dont chaque organe présentant des lésions était immunomarcqué, nos résultats étaient bien plus mitigés, ce qui suggère que ces derniers sont à interpréter avec précaution et que des étapes additionnelles de validation du protocole seraient nécessaires pour obtenir un marquage plus fiable.

Dans l'étude de Höfle et collaborateurs (Höfle et al., 2013), les immunomarquages étaient positifs dans les neurones des hémisphères cérébraux, dans les cellules gliales et plus rarement dans les cellules de Purkinje et les neurones des ganglions nerveux, dans les cellules myocardiques et les cellules de l'épithélium des tubules rénaux. Le marquage neuronal se retrouve dans notre étude, de même que le marquage des cellules myocardiques. Il n'a en revanche pas été observé de marquages dans d'autres types cellulaires identifiables que les neurones. De même aucun marquage rénal n'a pu être objectivé, ce qui reste cohérent avec les rares lésions rénales citées précédemment.

Concernant les prélèvements rétrospectifs retrouvés dans la base de données de VetDiagnostics, nous ne disposons pas de résultats virologiques associés, ce qui nous a empêché de conclure avec certitude sur l'implication du virus Usutu dans ces décès.

On peut toutefois noter que le recours à l'immunomarcage a permis de renforcer la suspicion d'atteinte par USUV pour des cas anciens non testés en RT-PCR USUV dont les lésions évoquaient une atteinte par le virus Usutu. Notamment, une chouette lapone non testée en RT-PCR USUV, morte en 2013 (V13-4691), donc avant les premiers cas français connus de mortalités dues à USUV. Ce cas était très proche histologiquement (nécrose hépatique et polioencéphalite mononucléée) d'une autre chouette lapone de 2013, du même âge et provenant du même parc, ce qui suggère une étiologie commune. Ces résultats corroborent ceux de l'étude sérologique de Vittecoq et collaborateurs (Vittecoq et al., 2013) et vont dans le sens de l'hypothèse selon laquelle le virus aurait émergé en France dès 2009.

Dans le temps imparti pour ma thèse, je n'ai pu profiter d'une mise au point plus fine de la technique d'immunomarcage. Ces résultats préliminaires mériteraient d'être approfondis par d'autres études rétrospectives.

B. Biais et limites de l'étude

1) Les effectifs

Le manque de cas au sein de cette étude a constitué un frein à l'interprétation des résultats. Les effectifs réduits ont entraîné une faible puissance statistique, d'autant plus pour l'étude des facteurs où il a été fréquent d'observer des effectifs par catégorie d'un ou deux cas. En effet, plusieurs espèces (chouette de l'Oural, chouette de Tengmalm, grand tétras), n'étaient représentées chacune que par un seul individu.

Les résultats parcellaires obtenus étaient dus en grande partie aux cas peu nombreux retrouvés après 2018. L'étude se fondait sur les cas positifs en analyse virologique et déjà recueillis avant 2018 mais surtout sur les cas prévus à partir de l'été 2019. Or aucun nouveau cas n'a pu être ajouté à l'étude, ce qui a considérablement restreint nos analyses, malgré l'ajout de cas anciens non testés en RT-PCR USUV. Ce silence soudain du virus n'a pas été totalement élucidé, mais l'une des hypothèses avancées est la diminution des températures moyennes observées durant les étés 2019, 2020 et 2021. L'année 2018 avait obtenue des records de chaleur ce qui aurait pu être favorable au maintien de populations conséquentes de moustiques *Culex* et *Aedes*, à l'origine des fortes mortalités observées. De plus, une immunité collective s'est probablement développée à la suite de l'épizootie de 2018, comme déjà observé à la suite de l'épizootie de 2001-2002 en Autriche (Meister et al., 2008).

Seuls 34 % des cas ont été analysés en immunohistochimie, en raison de limitations financières. Une sélection plus fine des cas aurait pu permettre de contourner cette difficulté, en sélectionnant uniquement des chouettes lapones par exemple, et en privilégiant les lames avec au moins un prélèvement de foie, de rate ou de cerveau.

2) La fiabilité des résultats

La multiplicité des opérateurs lors de la réalisation des autopsies et la précision variable des données indiquées sur les rapports d'autopsie a constitué un biais opérateur pour l'interprétation des lésions macroscopiques, d'autant que les autopsies ont été réalisées sans grille d'analyse commune.

De même, les analyses histologiques étaient soumises à l'expérience des opérateurs qui les réalisaient. Toutes les lames étudiées au cours de cette étude ont été lues par le Dr Karin Lemberger, anatomopathologiste diplômée du Collège américain des pathologistes vétérinaires (ACVP), afin d'avoir les résultats les plus précis et les plus fiables possible. Ma relecture des lames histologiques a donc toujours été réalisée à la lumière des résultats du Dr Lemberger, ce qui n'exclue pas un biais opérateur.

Le virus Usutu engendre principalement des lésions de nécrose fibrinoïde, or cette lésion rend la lecture des lames histologiques beaucoup plus ardue et peut notamment cacher la présence

d'autres micro-organismes. Le diagnostic histologique n'apporte donc que des suspicions d'atteinte par USUV et ne peut confirmer l'étiologie à lui seul.

Enfin, l'état de conservation des cadavres était un biais important pour l'interprétation des lésions. En effet l'autolyse a compliqué l'analyse de plusieurs cas car elle a limité la visualisation des lésions en désorganisant les tissus, mais a aussi pu être confondue avec des plages de nécrose.

3) Critiques et biais des protocoles d'analyse

a. Le plan d'échantillonnage

Les cas étudiés ont été recueillis entre 2013 et 2019, ce qui correspondait plusieurs épizooties distinctes, contrairement aux études auxquelles ce présent travail a été confronté, qui concernaient chacune une épizootie bien définie (Bakonyi et al., 2007 ; Becker et al., 2012 ; Chvala et al., 2004).

b. Le scoring histologique

Par souci de simplification, le choix a été fait de regrouper les lésions par pattern lésionnel. Par exemple, étaient considérées comme atteinte splénique, la nécrose splénique, la lymphocytolyse et l'inflammation splénique qu'elle soit mononucléée ou hétérophilique. De même, le terme inflammation regroupait l'inflammation mononucléée et l'accumulation d'hétérophiles et de plasmocytes. Cette simplification a pu entraîner un biais pour l'interprétation et l'étude des facteurs. Cependant, cette dénomination a également permis de regrouper sous un même titre les différents modes d'action du virus, qui peut différer selon l'immunité individuelle et divers autres facteurs (dose infectieuse, facteurs concomitants...).

c. L'immunohistochimie

Les lésions histologiques que nous supposons être dues à USUV étaient marquées très aléatoirement, contrairement aux autres études IHC, ce qui laisse supposer soit que les antigènes viraux étaient absents des lésions (lésions anciennes ou non dues à USUV), soit que quelque chose empêchait la fixation du marqueur aux antigènes.

La dégradation des tissus par autolyse a pu s'accompagner d'une dégradation des antigènes viraux et donc d'une altération de l'immunomarquage. La bonne fixation des tissus dans le formol était donc primordiale. La profondeur de pénétration du formol dans les tissus est inférieure à 1 cm, raison pour laquelle il était préconisé que les échantillons fassent 1 cm³ maximum. Or les échantillons qui ont été fournis n'étaient pas toujours de taille adéquate. En l'absence de fixation dans le formol les tissus s'autolysent : c'est ce qui advient pour le cœur des prélèvements d'épaisseur trop importante. Cependant, l'autolyse des échantillons soumis en IHC correspondait aux échantillons autolysés analysés en histologie et ne suffisait donc pas à expliquer la présence de lésions histologiques compatibles avec USUV mais non immunomarquées. Plusieurs autres hypothèses pourraient permettre d'expliquer nos résultats.

Ainsi, si la mauvaise fixation dans le formol entraîne de l'autolyse, une conservation trop longue dans le formol risque de masquer définitivement les sites de fixation des anticorps et donc d'empêcher l'immunomarquage. Cette hypothèse constitue une piste de réflexion pour expliquer le faible nombre de marquages que nous avons obtenus.

En outre, le virus Usutu fait particulièrement intervenir dans son schéma pathogénique les médiateurs inflammatoires à l'origine des lésions de nécrose et la cascade d'apoptose par voie immunitaire. Or ces derniers, consécutifs à l'emballement du système immunitaire, ne sont pas marqués en immunohistochimie, par absence d'antigènes viraux. Ce type de lésions n'est donc pas associé à un marquage IHC, malgré la présence de lésions.

L'une des principales difficultés de l'IHC a été la fixation des anticorps sur les antigènes viraux uniquement, sans artéfacts de fixation. Nos lames présentaient un bruit de fond très important, surtout pour les prélèvements hépatiques, rendant l'interprétation très ardue, voire impossible. Les témoins négatifs ne présentant pas de bruit de fond, il s'agissait sûrement des anticorps primaires qui ne se fixaient pas de manière spécifique à l'antigène viral. Une autre étude menée en 2007 avait éprouvé des difficultés similaires pour l'analyse du foie et des reins, en raison d'un bruit de fond important (Bakonyi et al., 2007), ce qui constitue une piste pour expliquer le bruit de fond observé sur nos propres lames. En effet, une fixation des anticorps primaires sur les antigènes endogènes des tissus hépatiques était possible en raison de la différence entre le lapin et les espèces étudiées (Abcam, sans date) et de l'utilisation d'un anticorps polyclonal et non monoclonal, ce qui a probablement contribué à former un bruit de fond. **L'anticorps primaire ne paraît donc pas être assez spécifique pour l'étude du foie, mais semble plutôt correct pour l'étude des autres organes.**

Ainsi, le recours à l'immunohistochimie pour confirmer l'implication d'USUV dans les lésions objectivées à l'histologie paraissait être une bonne méthode, mais la complexité de mise en œuvre, les aléas du marquage et les difficultés de lecture en ont fait un **outil de détection insuffisant dans notre étude, qui mériterait d'être affiné.**

C. Perspectives et questions soulevées par l'étude

Si cette étude a offert des résultats histologiques intéressants qui étaient globalement concordants avec la littérature, l'étude des différents tropismes lésionnels observés n'a mis en évidence aucun facteur susceptible de modifier le tropisme d'organe du virus. Il serait intéressant de mener une étude approfondie de l'effet de la souche sur le tropisme d'organe, mais aussi sur la variabilité d'expression lésionnelle. En effet, cette étude s'intéressait à l'influence de divers facteurs sur le tropisme d'organe, sans tenir compte de la variabilité d'expression lésionnelle au sein de chaque organe.

Ce travail mériterait d'être poursuivi lors de futures épizooties d'USUV, en se concentrant peut être davantage sur une ou deux espèces très fréquemment touchées par le virus.

La mise en évidence d'un immunomarquage USUV chez une chouette lapone de 2013, soit deux ans avant les premiers cas connus morts du virus Usutu en France, amène à se questionner sur les premiers cas réels de mortalité consécutifs à l'atteinte par USUV sur le territoire français. Affiner la technique d'IHC permettrait d'explorer de manière plus fiable les cas de façon rétrospective.

Des cas compatibles histologiquement avec le virus Usutu mais négatifs en RT-PCR USUV, amènent à s'interroger sur la spécificité du pattern lésionnel objectivé au cours de cette étude. Cette réflexion pourrait mener à une étude à part entière sur le diagnostic différentiel histologique et symptomatologique du virus Usutu.

CONCLUSION

Le virus Usutu est un virus émergent depuis une dizaine d'années en France, à l'origine de fortes mortalités de merles noirs et de chouettes lapones principalement. Les lésions histologiques secondaires à l'infection par le virus Usutu ont été étudiées dans nombre de pays européens, mais peu en France. Ce travail répertorie et inventorie les lésions macroscopiques et histologiques observées lors d'atteinte et de suspicion d'atteinte par le virus Usutu, sur des oiseaux Passeriformes et Strigiformes, retrouvés morts en France entre 2013 et 2019. Pour ce faire, nous nous sommes concentrés sur trois axes principaux : les organes et les lésions histologiques d'intérêt pour le diagnostic d'USUV, les facteurs pouvant influencer le tropisme d'organe et la mise en relation des lésions et de la présence du virus dans les tissus.

Même si cette étude ne démontre pas de lien évident entre la présence de lésions histologiques et les lésions à l'autopsie, les principaux signes d'appels d'infection virale par USUV à l'autopsie sont l'hépatomégalie et la splénomégalie. Cependant, l'hypothèse d'une infection par USUV ne peut être écartée en l'absence d'organomégalie. Ce travail montre en outre que les lésions induites par l'infection sont principalement périvasculaires et correspondant souvent à une splénite nécrosante, une hépatite nécrosante modérée à sévère, une polioencéphalite avec neuronophagie et parfois une nécrose neuronale, des thromboses pulmonaires parfois accompagnées de nécrose pulmonaire et une myocardite nécrosante, non systématique.

Nous avons également montré que la rate semble être un organe de choix pour l'étude des lésions histologiques, comme pour la réalisation d'immunomarquages.

Une étude rétrospective a permis d'identifier sept cas non testés en RT-PCR USUV mais dont les lésions histologiques et les commémoratifs étaient modérément à fortement compatibles avec une infection par le virus Usutu, dont deux cas similaires de 2013.

Ainsi, cette étude offre des pistes de réflexion, tant sur la pathogénie du virus, sur les facteurs influençant le tropisme d'organe, que sur l'apparition du virus en France et mériterait d'être poursuivie avec des cas plus nombreux et une amélioration de la méthode actuelle d'immunohistochimie.

BIBLIOGRAPHIE

ABCAM. *The definitive guide to HRP secondary antibodies for immunohistochemistry* [en ligne]. URL : <https://www.abcam.com/secondary-antibodies/the-definitive-guide-to-hrp-secondary-antibodies-for-immunohistochemistry-ihc> [consulté le 22/06/2022]

ASHRAF, U., YE, J., RUAN, X., WAN, S., ZHU, B., CAO, S. (2015). Usutu Virus: An Emerging Flavivirus in Europe [en ligne]. *Viruses*, 7(1), pp. 219–238.
Disponible sur : <https://www.mdpi.com/1999-4915/7/1/219> [consulté le 19/08/2020]

AUSTAD, S., FRAIFELD, V., FARAGHER, R., FREITAS, A., GEMS, D., KIRKWOOD, T. (2017). *AnAge: The Animal Ageing and Longevity Database* [en ligne]. URL : <https://genomics.senescence.info/species/index.html> [consulté le 02/08/2022]

BAKONYI, T. et al. (2007). Emergence of Usutu Virus in Hungary [en ligne]. *J. Clin. Microbiol.*, 45(12), pp. 3870–3874. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2168571/> [consulté le 26/09/2021]

BAKONYI, T., GOULD, E.A., KOLODZIEJEK, J., WEISSENBOCK, H., NOWOTNY, N. (2004). Complete genome analysis and molecular characterization of Usutu virus that emerged in Austria in 2001: Comparison with the South African Strain SAAR-1776 and other flaviviruses [en ligne] *Virology*, 328(2), pp. 301–310. Disponible sur : <http://www.scopus.com/inward/record.url?scp=5344252994&partnerID=8YFLogxK> [consulté le 13/09/2021]

BALENGHIEN, T., FOUQUE, F., SABATIER, P., BICOUT, D.J. (2006). *Horse-, Bird-, and Human-Seeking Behavior and Seasonal Abundance of Mosquitoes in a West Nile Virus Focus of Southern France* [en ligne]. *J. Med. Entomol.*, 43(5), pp. 936–946. Disponible sur : <https://academic.oup.com/jme/article/43/5/936/870301> [consulté le 17/06/2022]

BECKER, N. et al. (2012). Epizootic Emergence of Usutu Virus in Wild and Captive Birds in Germany [en ligne]. *PLoS One*, 7(2), pp. e32604. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3289667/> [consulté le 06/10/2021]

BELKAID, Y., BOUCKSON, V., GOOSSENS, P., LECLERCQ, V., LEBASTARD, M., MILON, G. (1993). Les cellules du système phagocytaire mononucléé et les leucocytes dendritiques [en ligne]. *Veterinary Research*, 24(4), pp. 359–362.
Disponible sur : <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00902140> [consulté le 18/03/2022]

BENZARTI, E., LINDEN, A., DESMECHT, D., GARIGLIANY, M. (2019). Mosquito-borne epornitic flaviviruses: an update and review [en ligne]. *J.Gen. Virol.*, 100(2), pp. 119–132. Disponible sur : <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.001203> [consulté le 02/05/2022]

BLÁZQUEZ, A.-B., ESCRIBANO-ROMERO, E., MERINO-RAMOS, T., SAIZ, J.-C., MARTÍN-ACEBES, M.A. (2013). Infection with Usutu virus induces an autophagic response in mammalian cells [en ligne] *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 7(10), pp. e2509.

Disponible sur : <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002509> [consulté le 06/10/2021].

BOULHAL, H. (2014). *Histologie du tissu nerveux* [en ligne]. Disponible sur : <https://docplayer.fr/51306802-Histologie-tissusnerveux.html> [consulté le 13/03/2022]

BOULTON, M.E., MITTER, S.K., RAO, H.V., DUNN, W.A. Chapter 24 - Cell Death, Apoptosis, and Autophagy in Retinal Injury [en ligne], in: SCHATCHAT, A.P. (dir.) et al. (2013). *Retina (Fifth Edition)*. Londres : W.B. Saunders, pp. 537–552. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781455707379000242> [consulté le 14/06/2022]

BYRNE, S.N., HALLIDAY, G.M., JOHNSTON, L.J., KING, N.J.C. (2001). Interleukin-1 β But Not Tumor Necrosis Factor is Involved in West Nile Virus-Induced Langerhans Cell Migration from the Skin in C57BL/6 Mice [en ligne]. *J. Investig. Dermatol.* 117(3), pp. 702–709. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X15413697> [consulté le 08/04/2022]

CADAR, D., BECKER, N., CAMPOS, R. de M., BÖRSTLER, J., JÖST, H., SCHMIDT-CHANASIT, J. (2014). Usutu Virus in Bats, Germany, 2013 [en ligne]. *Emerg. Infect. Dis.*, 20(10), pp. 1771–1773. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4193186/> [consulté le 19/08/2020]

CADAR, D. et al. (2017). Widespread activity of multiple lineages of Usutu virus, western Europe, 2016 [en ligne]. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.*, 22(4), pp. 30452. Disponible sur : <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.4.30452> [consulté le 24/04/2022]

CALZOLARI, M. et al. (2017). Co-circulation of two Usutu virus strains in Northern Italy between 2009 and 2014 [en ligne]. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.*, 51, pp. 255–262. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1567134817301053?via%3Dihub> [consulté le 13/09/2021]

CHVALA, S., KOLODZIEJEK, J., NOWOTNY, N., WEISSENBÖCK, H. (2004). Pathology and Viral Distribution in Fatal Usutu Virus Infections of Birds from the 2001 and 2002 Outbreaks in Austria [en ligne]. *J. Comp. Pathol.*, 131(2-3), pp. 176–85. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021997504000441> [consulté le 23/09/2021]

CLÉ, M. et al. (2018). Le virus Usutu : la menace fantôme [en ligne]. *Med. Sci*, 34(8-9), pp. 709–716. Disponible sur : <https://www.medecinesciences.org/articles/medsci/abs/2018/08/msc180154/msc180154.html> [consulté le 30/04/2022]

CLÉ, M. et al. (2019). Usutu virus: A new threat? [en ligne]. *Epidemiol. Infect.*, 147, pp. e232.

Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6625183/> [consulté le 21/09/2021]

CLÉ, M. et al. (2020). Study of Usutu virus neuropathogenicity in mice and human cellular models [en ligne]. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 14(4), pp. e0008223.

Disponible sur : <https://hal.umontpellier.fr/hal-02886700> [consulté le 07/04/2022]

CLÉ, M. et al. (2021). Differential neurovirulence of Usutu virus lineages in mice and neuronal cells [en ligne]. *J. Neuroinflammation*, 18(1), pp.11.

Disponible sur : <https://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12974-020-02060-4> [consulté le 06/10/2021]

CNRTL, Centre National de Ressources Textuelles et Lexicales [en ligne]. URL : <https://www.cnrtl.fr/definition/enzootie> [consulté le 28/04/2022]

CONSTANT, O. et al. (2020). Evidence of Exposure to USUV and WNV in Zoo Animals in France [en ligne] *Pathogens*, 9(12), pp. 1005.

Disponible sur : <https://www.mdpi.com/2076-0817/9/12/1005> [consulté le 12/03/2022].

COOK, C.L. et al. (2018). North American *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* are competent vectors for Usutu virus [en ligne]. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 12(8), pp. e0006732.

Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6114897/> [consulté le 24/05/2022]

DAMJANOV, I. (dir), Chapter 1 : Cell Pathology (2009). *Pathology Secrets*. Philadelphie : Mosby Elsevier, pp. 7–18

DECORS, A. et al. (2019). 2018, en France : un record de circulation du virus Usutu [en ligne]. *Faune Sauvage*, 324, pp. 9–14. Disponible sur :

https://professionnels.ofb.fr/sites/default/files/pdf/RevueFS/FauneSauvage324_2019_Art2.pdf [consulté le 30/04/2022]

DIAGNE, M.M. et al. (2019). Usutu Virus Isolated from Rodents in Senegal [en ligne]. *Viruses*, 11(2), pp. 181. Disponible sur : <https://www.mdpi.com/1999-4915/11/2/181> [consulté le 11/09/2021]

IVIS (2009) *Diagnostic Value of Hematology* [en ligne], URL :

<https://www.ivis.org/library/clinical-avian-medicine/diagnostic-value-of-hematology> [consulté le 11/05/2022].

SIMPSON, D.I.H. (1993). Toga and flaviviruses. *Virus Infections of Birds*. Belfast : Elsevier. pp. 231–241.

DONADIEU, E., BAHUON, C., LOWENSKI, S., ZIENTARA, S., COULPIER, M., LECOLLINET, S. (2013). Differential virulence and pathogenesis of West Nile viruses [en ligne]. *Viruses*, 5(12), pp. 2856–2880. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3856419/> [consulté le 13/10/2022]

EIDEN, M. et al. (2018). Emergence of two Usutu virus lineages in *Culex pipiens* mosquitoes in the Camargue, France, 2015 [en ligne]. *Infect. Genet. Evol.*, 61, pp. 151–154. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1567134818301205?via%3Dihub> [consulté le 30/04/2022]

EMILE, J.-F., LETEURTRE, E., GUYÉTANT, S. (2012). *Pathologie générale : Enseignements thématiques - Bopathologie tissulaire*, Issy-les-Moulineaux: Elsevier Masson, 280 p.

ENGEL, D. et al. (2016). Reconstruction of the Evolutionary History and Dispersal of Usutu Virus, a Neglected Emerging Arbovirus in Europe and Africa [en ligne]. *mBio*, 7(1), pp. e01938-01915. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4742707/> [consulté le 27/04/2022]

FANTUZZI, V. (2021). *Spectre d'hôtes et facteurs de risque du virus Usutu chez l'avifaune captive française*. Thèse de doctorat vétérinaire. Créteil : Faculté de Médecine, 115 p.

FARAJ, S.S. (2016). The Morphological Description and Histological Structure of the Liver in Marsh Harrier Bird in Iraq (*Circus aeruginosus*) [en ligne], *Int. J. Sci. Res.*, 7(1), pp. 528-532. Disponible sur : https://www.researchgate.net/publication/325545194_The_morphological_description_and_histological_structure_of_the_liver_in_marsh_harrier_bird_in_Iraq_Circus_aeruginosus [consulté le 12/05/2022]

FIACRE, L., PAGÈS, N., ALBINA, E., RICHARDSON, J., LECOLLINET, S., GONZALEZ, G. (2020). Molecular Determinants of West Nile Virus Virulence and Pathogenesis in Vertebrate and Invertebrate Hosts [en ligne]. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(23), pp. 9117. Disponible sur : <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/23/9117> [consulté le 24/05/2022]

FOWLER, M.E. Nutritional disorders of birds. In : MILLER, R.E (1986). *Zoo and Wild Animal Medicine* (Second edition). Saint-Louis : Elsevier Saunders.

FROS, J.J. et al. (2015). Comparative Usutu and West Nile virus transmission potential by local *Culex pipiens* mosquitoes in north-western Europe [en ligne]. *One Health Amst. Neth.*, 1, pp. 31–36. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352771415000063?via%3Dihub> [consulté le 02/05/2022].

GAIBANI, P. et al. (2013). Comparative Genomic and Phylogenetic Analysis of the First Usutu Virus Isolate from a Human Patient Presenting with Neurological Symptoms [en ligne]. *Plos One*, 8(5), pp. e64761. Disponible sur : <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0064761> [consulté le 27/04/2022].

GAIBANI, P., ROSSINI, G. (2017). An overview of Usutu virus [en ligne]. *Microbes Infect.*, 19(7), pp. 382–387. Disponible sur : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457917300850> [consulté le 04/11/2020]

GAMINO, V. et al. (2021). Pathogenesis of Two Western Mediterranean West Nile Virus Lineage 1 Isolates in Experimentally Infected Red-Legged Partridges (*Alectoris rufa*) [en ligne]. *Pathogens*, 10(6), 748. Disponible sur : <https://www.mdpi.com/2076-0817/10/6/748> [consulté le 13/10/2021]

GARCIN, E. (1944). *Guide vétérinaire*. Paris : Editions de Montsouris, 255 p.

GIGLIA, G. et al. (2021). Pathology and Pathogenesis of Eurasian Blackbirds (*Turdus merula*) Naturally Infected with Usutu Virus [en ligne]. *Viruses*, 13(8), pp. 1481. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8402641/> [consulté le 8/10/2021].

GROTTOLA, A. et al. (2017). Usutu virus infections in humans: a retrospective analysis in the municipality of Modena, Italy [en ligne]. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 23(1), pp. 33–37.
Disponible sur : [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(16\)30425-6/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(16)30425-6/fulltext) [consulté le 24/04/2022]

LIEBICH, H.-G. (2019). *Veterinary Histology of Domestic Mammals and Birds*. 5e édition. London : 5M Books Ltd, 504 p.

HÖFLE, U., GAMINO, V., MERA, I.G.F. de, MANGOLD, A.J., ORTÍZ, J.-A., FUENTE, J. de la (2013). Usutu Virus in Migratory Song Thrushes, Spain [en ligne]. *Emerg. Infect. Dis.*, 19(7). Disponible sur : https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/19/7/13-0199_article [consulté le 26/09/2021]

HOLBROOK, M.R. (2017). Historical Perspectives on Flavivirus Research [en ligne]. *Viruses*, 9(5), pp. 97. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5454410/> [consulté le 06/02/2022]

HUSSMANN, K.L., SAMUEL, M.A., KIM, K.S., DIAMOND, M.S., FREDERICKSEN, B.L. (2013). Differential Replication of Pathogenic and Nonpathogenic Strains of West Nile Virus within Astrocytes [en ligne]. *J. Virol.*, 87(5), pp. 2814–2822. Disponible sur : <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JVI.02577-12> [consulté le 07/04/2022]

JÖST, H. (2011). Isolation of Usutu Virus in Germany [en ligne]. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 85(3), pp. 551–553. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3163883/> [consulté le 03/05/2022]

JULIAN, R.J. (2002). *The avian cardiovascular system* [en ligne]. American Association of Avian Pathologist, 10 p.
Disponible sur : <https://aaap.memberclicks.net/assets/Slides/cardiovascular.pdf>

KUBALE, V., MERRY, K., MILLER, G., RUIZ-DIAZ, M.D., RUTLAND, C.S. Application of Genetics and Genomics in Poultry Science (2018). *Avian Cardiovascular Disease Characteristics, Causes and Genomics*, London : InTechOpen., pp. 141-162.

KUCHINSKY, S.C., HAWKS, S.A., MOSSEL, E.C., COUTERMARSH-OTT, S., DUGGAL, N.K. (2020). Differential pathogenesis of Usutu virus isolates in mice [en ligne]. *PLoS Negl. Trop. Dis.*,

14(10), pp. e0008765. Disponible sur : <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0008765> [consulté le 27/04/2022]

KUNO, G., CHANG, G.-J.J. (2005). Biological Transmission of Arboviruses : Reexamination of and New Insights into Components, Mechanisms, and Unique Traits as Well as Their Evolutionary Trends [en ligne]. *Clin. Microbiol. Rev.*, 18(4), pp. 608–637. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1265912/> [consulté le 08/04/2022]

LECOLLINET, S. et al. (2016). Dual Emergence of Usutu Virus in Common Blackbirds, Eastern France, 2015 [en ligne]. *Emerg. infect. Dis. J.*, 22(12). Disponible sur : https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/22/12/16-1272_article [consulté le 26/09/2021]

CALZOLARI, M. et al. (2010). Evidence of simultaneous circulation of West Nile and Usutu viruses in mosquitoes sampled in Emilia-Romagna region (Italy) in 2009 [en ligne]. *Plos One*, 5(12), pp. e14324–e14324. Disponible sur : <https://europepmc.org/article/MED/21179462> [consulté le 04/05/2022]

MANAROLLA, G. (2010). Usutu virus in wild birds in northern Italy [en ligne]. *Vet. Microbiol.*, 141(1), pp. 159–163. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113509003587> [consulté le 13/06/2022]

MCDONOUGH, S., SOUTHARD, T. (2017). *Necropsy Guide for dogs, cats and small mammals*. Medford : John Wiley & Sons, Inc, 200 p.

MCGAVERN, D.B., HOMANN, D., OLDSTONE, M.B.A. (2002). T Cells in the Central Nervous System: The Delicate Balance between Viral Clearance and Disease [en ligne]. *J. Infect. Dis.*, 186(Suppl 2), pp. S145–S151. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5319418/> [consulté le 14/06/2022]

MEISTER, T. et al. (2008). Serological evidence of continuing high Usutu virus (Flaviviridae) activity and establishment of herd immunity in wild birds in Austria [en ligne]. *Vet. Microbiol.*, 127(3), pp. 237–248. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113507004154> [consulté le 30/04/2022]

MESSAM, C.A., HOU, J., JANABI, N., MONACO, M.C., GRAVELL, M., MAJOR, E.O. Glial Cell Types, In : RAMACHANDRAN, V.S. (2002) *Encyclopedia of the Human Brain*. Amsterdam : Elsevier, pp. 369–387.

Michel, F. et al. (2018). West Nile Virus and Usutu Virus Monitoring of Wild Birds in Germany [en ligne]. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 15(1), pp. 171. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5800270/> [consulté le 21/06/2022]

OMS (2021). *Dengue et dengue sévère* [en ligne]. URL : <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> [consulté le 04/06/2022]

OMS (2020). Zoonoses [en ligne]. URL : <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/zoonoses> [consulté le 09/05/2022]

OLLIVIER, M. (2021). *Prévention du virus Usutu dans les parcs zoologiques français : de l'élaboration d'une lutte vectorielle à l'étude d'une vaccination croisée*. Thèse de doctorat vétérinaire. Créteil : Faculté de Médecine, 98 p.

PAZ, S. (2015). Climate change impacts on West Nile virus transmission in a global context [en ligne]. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, 370(1665), pp. 20130561. Disponible sur : <https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rstb.2013.0561> [consulté le 16/06/22]

Pecorari, M. et al. (2009). First human case of Usutu virus neuroinvasive infection, Italy, August-September 2009 [en ligne]. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.*, 14(50), pp. 19446. Disponible sur : <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/ese.14.50.19446-en> [consulté le 8/09/2020]

PLATT, K.B., LINTHICUM, K.J., MYINT, K.S.A., INNIS, B.L., LERDTHUSNEE, K., VAUGHN, D.W. (1997). Impact of Dengue Virus Infection on Feeding Behavior of *Aedes aegypti* [en ligne]. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 57(2), pp. 119–125. Disponible sur : <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/57/2/article-p119.xml> [consulté le 05/05/2022]

RADALL, C., REECE, R. (1996). *Color Atlas of Avian histopathology*. St-Louis : Mosby-Wolfe, 233 p.

Rijks, J.M. et al. (2016). Widespread Usutu virus outbreak in birds in the Netherlands, 2016 [en ligne]. *Eurosurveillance*, 21(45), pp. 30391. Disponible sur : <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.45.30391> [consulté le 13/06/2022]

ROESCH, F., FAJARDO, A., MORATORIO, G., VIGNUZZI, M. (2019). Usutu Virus: An Arbovirus on the Rise [en ligne]. *Viruses*, 11(7), pp. e640. Disponible sur : <https://europepmc.org/articles/PMC6669749/> [consulté le 18/08/2019]

Rubel, F. et al. (2008). Explaining Usutu virus dynamics in Austria: Model development and calibration [en ligne]. *Prev. Vet. Med.*, 85(3), pp.166–186. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587708000226> [consulté le 24/04/2022]

SAIZ, J.-C., BLAZQUEZ, A.-B. (2017). Usutu virus: current knowledge and future perspectives [en ligne]. *Virus Adapt. Treat.*, 9, pp. 27–40. Disponible sur : <https://www.dovepress.com/usutu-virus-current-knowledge-and-future-perspectives-peer-reviewed-fulltext-article-VAAT> [consulté le 13/09/2021]

SANTOS, P.D. et al. (2022). Co-infections: Simultaneous detections of West Nile virus and Usutu virus in birds from Germany [en ligne]. *Transbound. Emerg. Dis.*, 69(2), pp. 776–792.

Disponible sur : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/tbed.14050> [consulté le 29/04/2022]

SAVINI, G. et al. (2011). Usutu virus in Italy: an emergence or a silent infection? [en ligne] *Vet. Microbiol.*, 151(3-4), pp. 264–274. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113511002100?via%3Dihub> [consulté le 09/02/2021]

SIMONIN, Y. et al. (2018). Human Usutu Virus Infection with Atypical Neurologic Presentation, Montpellier, France, 2016 [en ligne]. *Emerg. Infect. Dis.*, 24(5), pp. 875–878. Disponible sur : <https://europepmc.org/articles/PMC5938765> [consulté le 01/05/2022]

SMIT, J.M., MOESKER, B., RODENHUIS-ZYBERT, I., WILSCHUT, J. (2011). Flavivirus cell entry and membrane fusion [en ligne]. *Viruses*, 3(2), pp. 160–171. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3206597/> [consulté le 17/09/2021].

STEINMETZ, H.W. et al. (2011). Emergence and establishment of Usutu virus infection in wild and captive avian species in and around Zurich, Switzerland-Genomic and pathologic comparison to other central European outbreaks [en ligne]. *Vet. Microbiol.*, 148(2), pp. 207–212. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113510004530> [consulté le 02/05/2022]

TRÖSCHER, A.R. et al. (2019). Microglial nodules provide the environment for pathogenic T cells in human encephalitis [en ligne]. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 137(2), pp. 619–635. Disponible sur : <https://link.springer.com/article/10.1007/s00401-019-01958-5> [consulté le 14/06/2022]

VABRET, A., MISZCZAK, F. (2010). Changement de tropisme des coronavirus [en ligne]. *Rev. Francoph. Lab.*, 2010(423), pp. 63–68. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7140254/> [consulté le 13/03/2022]

VÁZQUEZ, A. et al. (2011a). Usutu virus: potential risk of human disease in Europe [en ligne]. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.*, 16(31), pp. 19935. Disponible sur : <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/ese.16.31.19935-en> [consulté le 12/11/2021]

VÁZQUEZ, A. et al. (2011b). West Nile and Usutu Viruses in Mosquitoes in Spain, 2008–2009 [en ligne]. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 85(1), pp. 178–181. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3122364/> [consulté le 03/05/2022]

VERMA, S. et al. (2009). West Nile virus infection modulates human brain microvascular endothelial cells tight junction proteins and cell adhesion molecules: Transmigration across the in vitro blood-brain barrier [en ligne]. *Virology*, 385(2), pp. 425–433. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682208007599> [consulté le 07/04/2022]

VITTECOQ, M. et al. (2013). Recent circulation of West Nile virus and potentially other closely related flaviviruses in Southern France [en ligne]. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 13(8). Disponible sur : https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/vbz.2012.1166?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed [consulté le 16/09/2021]

WANG, L., XIONG, X., ZHANG, L., SHEN, J. (2021). Neurovascular Unit: A critical role in ischemic stroke [en ligne]. *CNS Neurosci. Ther.*, 27(1), pp. 7–16. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7804897/> [consulté le 07/04/2022]

WEISSENBOCK, H., BAKONYI, T., CHVALA, S., NOWOTNY, N. (2004). Experimental Usutu virus infection of suckling mice causes neuronal and glial cell apoptosis and demyelination [en ligne]. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 108(5), pp. 453–460. Disponible sur : <http://link.springer.com/10.1007/s00401-004-0916-1> [consulté le 19/08/2020]

WEISSENBOCK, H., BAKONYI, T., ROSSI, G., MANI, P., NOWOTNY, N. (2013). Usutu virus, Italy, 1996 [en ligne]. *Emerg. Infect. Dis.*, 19(2), pp. 274–277. Disponible sur : https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/19/2/12-1191_article [consulté le 14/05/2021]

WEISSENBOCK, H., KOLODZIEJEK, J., FRAGNER, K., KUHN, R., PFEFFER, M., NOWOTNY, N. (2003). Usutu virus activity in Austria, 2001–2002 [en ligne]. *Microbes Infect.*, 5(12), pp. 1132–1136. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457903002041> [consulté le 26/09/2021]

WEISSENBOCK, H., KOLODZIEJEK, J., URL, A., LUSSY, H., REBEL-BAUDER, B., NOWOTNY, N. (2002). Emergence of Usutu virus, an African Mosquito-Borne Flavivirus of the Japanese Encephalitis Virus Group, Central Europe [en ligne]. *Emerg. Infect. Dis.*, 8(7), pp. 652–656. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2730324/> [consulté le 03/05/2022]

WOODALL, J.P. (1964). *The viruses isolated from arthropods at the East African Virus, Research Institute in the 26 years ending December 1963.* pp. 141–146.

WU, S.-J.L. et al. (2000). Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection [en ligne]. *Nat. Med.*, 6(7), pp. 816–820. Disponible sur : https://www.nature.com/articles/nm0700_816 [consulté le 08/04/2022]

WÜNSCHMANN, A., SHIVERS, J., CARROLL, L., BENDER, J. (2004). Pathological and immunohistochemical findings in American crows (*Corvus brachyrhynchos*) naturally infected with West Nile virus [en ligne]. *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc.*, 16(4), pp. 329–333. Disponible sur : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15305746/> [consulté le 08/10/2021]

ZIEGLER, U. et al. (2015). Epidemic Spread of Usutu Virus in Southwest Germany in 2011 to 2013 and Monitoring of Wild Birds for Usutu and West Nile Viruses [en ligne]. *Vector-Borne Zoonotic Dis.*, 15(8), pp. 481–488.

Disponible sur : https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/vbz.2014.1746?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed [consulté le 21/06/2022]

ANNEXES

Annexe 1 : Liste des parcs zoologiques participant au projet Usutu et répartition des prélèvements reçus (source personnelle)

Nom des parcs zoologiques	Espèces étudiées	Effectifs positifs en RT-PCR USUV	Effectifs non testés en RT-PCR USUV
Parc animalier de Sainte Croix (57)	Chouette lapone (<i>Strix nebulosa</i>)	2	
	Chouette de l'Oural (<i>Strix uralensis</i>)	1	
	Chouette de Tengmalm (<i>Aegolius funereus</i>)	1	
	Grand tétras (<i>Tetrao urogallus</i>)	1	
ZooParc de Beauval (41)	Chouette lapone (<i>Strix nebulosa</i>)	6	
Puy du Fou (85)	Chouette lapone (<i>Strix nebulosa</i>)	2	
Le Pal (03)	Chouette harfang (<i>Bubo scandiacus</i>)	2	
	Chouette à lunettes (<i>Pulsatrix perspicillata</i>)		1
	Chouette effraie (<i>Tyto alba</i>)		1
	Chouette lapone (<i>Strix nebulosa</i>)		1
Le Rocher des aigles (46)	Chouette lapone (<i>Strix nebulosa</i>)	3	
Refuge de l'arche (53)	Chouette lapone (<i>Strix nebulosa</i>)	2	
Zoo d'Amnéville (57)	Chouette lapone (<i>Strix nebulosa</i>)	1	
Zoo de Bordeaux Pessac (33)	Chouette lapone (<i>Strix nebulosa</i>)	1	
La Volerie des aigles (67)	Chouette lapone (<i>Strix nebulosa</i>)	1	
Zoo de la Flèche (72)	Chouette lapone (<i>Strix nebulosa</i>)		2
Zoo de Mulhouse (68)	Chouette lapone (<i>Strix nebulosa</i>)		5
Ménagerie du Jardin des plantes (75)	Chouette lapone (<i>Strix nebulosa</i>)		1

Annexe 2 : Origine des prélèvements hors parcs zoologiques

Origine des prélèvements	Espèces étudiées	Effectifs positifs en RT-PCR USUV	Effectifs non testés en RT-PCR USUV
Particuliers	Chouette lapone (<i>Strix nebulosa</i>)	1	1
Sauvage (OFB)	Merle noir (<i>Turdus merula</i>)	7	1

Annexe 3 : Questionnaire d'accompagnement des prélèvements (source personnelle)

Volet B :

Veillez remplir un exemplaire par spécimen retrouvé mort et le retourner avec l'échantillon correspondant

Q1 - Ordre : Strigiformes Passeriformes Accipitriformes Autre(s) :

Q2- Espèce (nom latin) :

Q3 - Numéro Arks interne de l'individu :

Q4 - Nombre d'individus retrouvés morts dans la volière :

Q5 - Date du décès :

Q6 - Organes prélevés :

(Date d'autopsie :))

(Sérologie effectuée sur ce spécimen ? Si oui quel en était le résultat ?)

Q7 - Lésions observées lors de l'autopsie :

Cerveau :

Foie :

Cœur :

Rate :

Poumons :

Reins :

Autres :

...

Q8 – L'animal a-t-il présenté des symptômes avant sa mort ? Oui Non

Veillez répondre aux questions suivantes uniquement si vous avez répondu Oui :

Q9 – Quels symptômes présentait-il ?.....

.....
.....
.....
.....
.....

Q10 – Depuis combien de temps évoluaient ces symptômes ?

.....
.....
.....

Q11 – Un traitement a-t-il été mis en place ? Oui – *Si vous avez coché cette case, veuillez préciser :*

.....
.....

Non

Q9 - Quelles étaient vos hypothèses diagnostic ?

Q10- Combien d'oiseaux présentaient les mêmes symptômes dans la volière ?

.....

Annexe 4 : Liste des cas sélectionnés pour les immunomarquages

Numéro d'identification du cas	Espèce	Année de mort
V13-4691	Merle noir (<i>Turdus merula</i>)	2013
V15-4179	Merle noir (<i>Turdus merula</i>)	2015
V16-06231	Chouette lapone (<i>Strix nebulosa</i>)	2016
V16-06232	Chouette lapone (<i>Strix nebulosa</i>)	2016
V17-06304	Chouette lapone (<i>Strix nebulosa</i>)	2017
V17-06504	Chouette lapone (<i>Strix nebulosa</i>)	2017
V18-06010	Chouette harfang (<i>Bubo scandiacus</i>)	2018
V18-06044	Chouette lapone (<i>Strix nebulosa</i>)	2018
V18-06087	Chouette lapone (<i>Strix nebulosa</i>)	2018
V18-06141	Chouette lapone (<i>Strix nebulosa</i>)	2018
V18-06243	Merle noir (<i>Turdus merula</i>)	2018
V18-06245	Merle noir (<i>Turdus merula</i>)	2018
V18-06640	Chouette lapone (<i>Strix nebulosa</i>)	2018
V18-06641	Chouette lapone (<i>Strix nebulosa</i>)	2018
V18-06642	Chouette lapone (<i>Strix nebulosa</i>)	2018
V18-06713	Grand tétra (<i>Tetrao urogallus</i>)	2018

Annexe 5 : Protocole d'immunomarquage du virus Usutu (@ENVA-Biopôle)

Protocole N° 306 : USUV sspt (13/06/2017)

Procédure: Res IHC Omni-UltraMap HRP XT

Module Discovery XT

Etape N°	Désignation des étapes
1	***** Début des étapes synchronisées*****
2	***** Sélectionner EZ Prep *****
3	Chauffer les Lames à 75 Deg C, et Incuber 8 Minutes
4	Dépôt EZPrep Volume Adjust (DXT)
5	Application Depar Volume Adjust (DXT)
6	Dépôt Coverslip (DXT)
7	Incuber 8 Minutes
8	Rincer la lame
9	Application Depar Volume Adjust (DXT)
10	Dépôt Coverslip (DXT)
11	Chauffer les Lames à 37 Deg C, et Incuber 4 Minutes
12	***** Sélectionner Rinçage SSC *****
13	***** Sélectionner EZ Prep *****
14	***** Sélectionner EZ Prep *****
15	Chauffage des lames désactivé
16	Incuber 8 Minutes
17	Rincer la lame avec Reaction Buffer
18	Ajuster le volume sur la lame avec Reaction Buffer
19	Dépôt Coverslip (DXT)
20	***** Sélectionner EZ Prep *****
21	***** Sélectionner Rinçage SSC *****
22	Chauffer les Lames à 37 Deg C, et Incuber 4 Minutes
23	Rincer la lame avec Reaction Buffer
24	Ajuster le volume sur la lame avec Reaction Buffer
25	Dépôt Coverslip (DXT)
26	Déposer une goutte de Inhibitor CM, et incuber 4 Minutes
27	Rincer la lame avec Reaction Buffer
28	Ajuster le volume sur la lame avec Reaction Buffer
29	Dépôt Coverslip (DXT)
30	***** Stations de mixage désactivées *****
31	***** Attendre la puce d'enregistrement (Mise en attente)*****
32	***** Stations de mixage activées *****
33	Rincer la lame avec Reaction Buffer
34	Ajuster le volume sur la lame avec Reaction Buffer
35	Dépôt Coverslip (DXT)
36	***** Stations de mixage désactivées *****
37	***** Application manuelle (Titration) *****
38	***** Stations de mixage activées *****
39	Incuber [32 Minutes] (Anticorps Primaire)
40	Rincer la lame avec Reaction Buffer
41	Ajuster le volume sur la lame avec Reaction Buffer
42	Dépôt Coverslip (DXT)
43	Rincer la lame avec Reaction Buffer
44	Ajuster le volume sur la lame avec Reaction Buffer
45	Dépôt Coverslip (DXT)

* Une goutte correspond à une dose de réactif

- 46 Rincer la lame avec Reaction Buffer
- 47 Ajuster le volume sur la lame avec Reaction Buffer
- 48 Déposer une goutte de [OMap anti-Rb HRP] (Multimer HRP), Appliquer Coverslip, et incuber [16 Minutes]
- 49 Rincer la lame avec Reaction Buffer
- 50 Ajuster le volume sur la lame avec Reaction Buffer
- 51 Dépôt Coverslip (DXT)
- 52 Rincer la lame avec Reaction Buffer
- 53 Ajuster le volume sur la lame avec Reaction Buffer
- 54 Dépôt Coverslip (DXT)
- 55 Rincer la lame avec Reaction Buffer
- 56 Ajuster le volume sur la lame avec Reaction Buffer
- 57 Dépôt Coverslip (DXT)
- 58 Rincer la lame avec Reaction Buffer
- 59 Ajuster le volume sur la lame avec Reaction Buffer
- 60 Déposer une goutte de DAB CM et une goutte de H2O2 CM, Déposer Huile de Paraffine, et incuber 8 Minutes
- 61 Rincer la lame avec Reaction Buffer
- 62 Ajuster le volume sur la lame avec Reaction Buffer
- 63 Déposer une goutte de Copper CM, Déposer Huile de Paraffine, et incuber 4 Minutes
- 64 Rincer la lame avec Reaction Buffer
- 65 Ajuster le volume sur la lame avec Reaction Buffer
- 66 Dépôt Coverslip (DXT)
- 67 ***** Sélectionner EZ Prep *****
- 68 Rincer la lame avec Reaction Buffer
- 69 Ajuster le volume sur la lame avec Reaction Buffer
- 70 Dépôt Coverslip (DXT)
- 71 Incuber 4 Minutes
- 72 Chauffage des lames désactivé
- 73 ***** Stations de mixage désactivées *****
- 74 ***** Attendre la puce d'enregistrement (Mise en attente pour la contre-coloration/nettoyage)*****
- 75 ***** Stations de mixage activées *****
- 76 ***** Sélectionner EZ Prep *****
- 77 Chauffer les Lames à 37 Deg C, et Incuber 4 Minutes
- 78 Rincer la lame avec Reaction Buffer
- 79 Ajuster le volume sur la lame avec Reaction Buffer
- 80 Déposer une goutte de [HEMATOXYLIN] (Contre-coloration), Appliquer Coverslip, et incuber [4 Minutes]
- 81 Rincer la lame avec Reaction Buffer
- 82 Ajuster le volume sur la lame avec Reaction Buffer
- 83 Dépôt Coverslip (DXT)
- 84 Rincer la lame avec Reaction Buffer
- 85 Ajuster le volume sur la lame avec Reaction Buffer
- 86 Déposer une goutte de [BLUING REAGENT] (Post Contre-Coloration), Appliquer Coverslip, et incuber [4 Minutes]
- 87 Rincer la lame avec Reaction Buffer
- 88 Ajuster le volume sur la lame avec Reaction Buffer
- 89 Dépôt Coverslip (DXT)
- 90 Rincer la lame avec Reaction Buffer

Annexe 7 : Détail pour chaque cas positif en RT-PCR USUV, des prélèvements d'organes soumis à l'analyse histologique

N° cas	Espèce	Rate	Foie	Cerveau	Poumons	Cœur	Reins	Pancréas
V15-04179	Merle noir	Autolyse	1	Autolyse	0	0	0	0
V16-06231	Chouette lapone	1	1	1	1	0	1	1
V16-06232	Chouette lapone	1	1	1	1	0	1	0
V16-06233	Chouette de l'Oural	1	1	0	1	1	1	0
V16-06234	Chouette de Tengmalm	1	0	0	1	1	1	0
V17-06304	Chouette lapone	1	1	1	1	1	1	1
V17-06504	Chouette lapone	1	1	0	1	1	0	1
V18-05805	Chouette lapone	1	1	0	1	1	1	0
V18-05921	Chouette lapone	1	1	1	1	1	1	1
V18-06010	Chouette harfang	1	1	1	1	0	1	1
V18-06044	Chouette lapone	1	1	1	1	1	1	1
V18-06045	Chouette lapone	0	1	1	1	1	1	1
V18-06087	Chouette lapone	1	1	1	1	1	1	1
V18-06088	Chouette lapone	1	1	0	1	0	1	1
V18-06141	Chouette lapone	1	1	1	1	1	1	1
V18-06143	Chouette harfang	0	1	1	1	0	1	1
V18-06239	Chouette lapone	1	1	1	1	1	1	0
V18-06243	Merle noir	1	1	1	1	1	1	0
V18-06244	Merle noir	Autolyse	Autolyse	Autolyse	Autolyse	1	0	0
V18-06245	Merle noir	1	1	1	1	1	1	1
V18-06396_1	Merle noir	1	Autolyse	1	1	1	0	0
V18-06396_2	Merle noir	1	1	1	1	1	0	0
V18-06426	Chouette lapone	1	1	1	1	1	1	1
V18-06598	Chouette lapone	1	1	1	1	1	1	1
V18-06640	Chouette lapone	0	1	1	1	1	1	1
V18-06641	Chouette lapone	1	1	1	1	1	1	1
V18-06642	Chouette lapone	0	1	1	1	1	1	1
V18-06678	Chouette lapone	1	1	1	1	1	0	0
V18-06713	Grand tétra	1	1	1	1	1	1	1
V18-06857	Chouette lapone	1	1	1	1	1	1	1

L'absence de prélèvement associé à l'organe est représentée par un 0 et la présence de prélèvement par un 1. Les organes autolysés sont également notés.

Annexe 6 : Détail pour chaque cas non testé en RT-PCR USUV, des prélèvements d'organes soumis à l'analyse histologique

N° cas	Espèce	Rate	Foie	Cerveau	Poumons	Cœur	Reins
V11-2605	Chouette lapone	1	1	1	0	0	1
V13-04644	Chouette lapone	1	1	1	1	1	1
V13-04691	Chouette lapone	1	1	1	1	1	1
V15-04176	Chouette lapone	1	1	0	1	1	1
V15-4198	Chouette lapone	0	1	0	1	1	1
V15-05433	Chouette lapone	0	1	0	1	1	1
V16-5261	Chouette lapone	0	1	0	1	0	1
V16-06796	Chouette lapone	1	1	0	1	1	1
V17-06207	Chouette lapone	0	1	0	1	1	1
V18-03195	Chouette à lunettes	1	1	1	1	1	1
V18-03926	Chouette effraie	1	1	0	1	1	1
V18-06371	Chouette lapone	1	1	1	1	0	1
V18-9073	Merle	Autolyse	1	1	0	0	0

L'absence de prélèvement associé à l'organe est représentée par un 0 et la présence de prélèvement par un 1. Les organes autolysés sont également notés.

Annexe 8 : Tableau récapitulatif des lésions histologiques retrouvées par organe chez les cas positifs en RT-PCR USUV

	Lésions microscopiques Sévérité des lésions	Chouette lapone (n=19)			Merle noir (n=6)			Chouette de l'Oural (n=1)		
		.+.	.++.	.+++.	.+.	.++.	.+++.	.+.	.++.	.+++.
RATE	Nécrose fibrinoïde splénique			14/16.		1/6.	3/6.			
	Congestion splénique						1/6.			
	Inflammation splénique	1/16.	6/16.			1/6.				
	Lymphocytolyse splénique			13/16.			2/6.			
	Hémosidérose			1/16.						1/1.
	Autolyse splénique					1/6.	1/6.			
	Hyperplasie lymphoïde								1/1.	
FOIE	Nécrose fibrinoïde hépatique	1/19.	6/19.	3/19.		3/6.				
	Congestion hépatique			16/19.			3/6.		0/1.	
	Lipidose hépatique		1/19.							
	Thrombi de fibrine	6/19.	5/19.			1/6.				
	Autolyse hépatique					1/6.	1/6.			
	Hémosidérose hépatique									
CERVEAU	Nécrose fibrinoïde cérébrale	2/16.								
	Neuronophagie	1/16.	4/16.			3/6.				
	Infiltrat nodulaire de mononucléés		4/16.	2/16.		2/6.	1/6.			
	Congestion			6/16.						
	Autolyse du cerveau					1/6.	1/6.			
POUMONS	Nécrose pulmonaire	2/19.	5/19.	1/19.						
	Congestion pulmonaire			8/19.			4/5.			
	Œdème pulmonaire			1/19.			3/5.			
	Thrombi de fibrine	2/19.	10/19.	4/19.						0/1.
	Hyphes fongiques	1/19.	1/19.							
	Granulome pulmonaire			1/19.						
	Autolyse pulmonaire						1/5.			
CŒUR	Inflammation mononucléée myocardique	2/16.				2/5.				
	Nécrose myocardique	3/16.				1/5.				
	Athérosclérose aortique									1/1.
	Fibrose myocardique	1/16.	1/16.							
REINS	Congestion rénale		2/17.	9/17.		1/2.	1/2.		0/1.	
	Inflammation mononucléée rénale	1/17.								

	Lésions microscopiques Sévérité des lésions	Chouette de Tengmalm (n=1)			Chouette harfang (n=2)			Grand tétras (n=1)		
		.+.	.++.	.+++.	.+.	.++.	.+++.	.+.	.++.	.+++.
RATE	Nécrose fibrinoïde splénique						1/1.			
	Congestion splénique									1/1.
	Inflammation splénique			1/1.		1/1.				
	Lymphocytolyse splénique						1/1.			1/1.
	Hémosidérose									
	Autolyse splénique									
	Hyperplasie lymphoïde			1/1.						
FOIE	Nécrose fibrinoïde hépatique					1/2.				
	Congestion hépatique						2/2.			1/1.
	Lipidose hépatique									
	Thrombi de fibrine					1/2.				
	Autolyse hépatique									
	Hémosidérose hépatique									1/1.
CERVEAU	Nécrose fibrinoïde cérébrale									
	Neuronophagie					1/2.				
	Infiltrat nodulaire de mononucléés					1/2.				
	Congestion						1/2.			1/1.
	Autolyse du cerveau									
POUMONS	Nécrose pulmonaire					1/2.				
	Congestion pulmonaire			1/1.			1/2.			1/1.
	Œdème pulmonaire									
	Thrombi de fibrine					1/2.				
	Hyphes fongiques					1/2.				
	Granulome pulmonaire						1/2.			
	Autolyse pulmonaire									
CŒUR	Inflammation mononucléée myocardique	1/1.								
	Nécrose myocardique								0/1.	
	Athérosclérose aortique	1/1.								
	Fibrose myocardique									
REINS	Congestion rénale			1/1.			1/2.			1/1.
	Inflammation mononucléée rénale									

Annexe 9 : Tableau récapitulatif des lésions histologiques retrouvées par organe chez les cas non testés en RT-PCR USUV

	Lésions microscopiques Sévérité des lésions	Chouette lapone (n=10)			Merle noir (n=1)			Chouette effraie (n=1)			Chouette à lunettes (n=1)		
		+. .+.	+. .+.	+++.	+. .+.	+++.	+. .+.	+++.	+. .+.	+++.	+. .+.	+++.	
RATE	Nécrose fibrinoïde splénique			3/6.					1/1.				
	Inflammation splénique	1/6.	1/6.								0/1.		
	Lymphocytolyse splénique			1/6.									
	Hyperplasie des cellules			2/6.									
	Autolyse splénique				1/1.								
FOIE	Nécrose fibrinoïde hépatique	1/10.	5/10.	4/10.		1/1.		1/1.					
	Congestion hépatique			7/10.							1/1.		
	Thrombi de fibrine		1/10.										
	Inflammation hépatique	2/10.	2/10.			1/1.		1/1.					
	Hémossidérose hépatique										1/1.		
	Hyperplasie des cellules réticuloendothéliales		1/10.										
CERVEAU	Infiltration mononucléée périvasculaire	1/4.	2/4.		0/1.						0/1.		
	Neuronophagie		1/4.										
POUMONS	Nécrose pulmonaire	1/9.	1/9.	2/9.									
	Congestion pulmonaire			8/9.				1/1.			1/1.		
	Thrombi de fibrine	2/9.	1/9.	2/9.									
	Œdème pulmonaire		1/9.	2/9.				1/1.					
CŒUR	Nécrose myocardique							1/1.			1/1.		
	Inflammation mononucléée myocardique		0/7.					1/1.		1/1.			
	Thrombi de fibrine							1/1.					
REINS	Congestion rénale			6/10.							1/1.		
	Nécrose tubulaire		2/10.					1/1.		1/1.			
	Inflammation mononucléée							1/1.			1/1.		
	Congestion multicentrique		9/10.					0/1.			1/1.		

Annexe 10 : Score lésionnel par cas positif en RT-PCR USUV, selon l'organe

Numéro du cas	Rate (n=23)	Foie (n=25)	Cerveau (n=22)	Poumons (n=26)	Cœur (n=21)	Reins (n=22)
V16-06231	0	0	6	0		0
V16-06232	0	0	5	0		0
V16-06234	3			0	1	0
V17-06304	6	3	0	3	0	1
V17-06504	6	3		0	0	
V18-05805	8	4		2	0	0
V18-05921	8	3	0	2	0	0
V18-06010	8	3	4	0		0
V18-06044	8	3	3	1	2	0
V18-06045		1	0	0	0	0
V18-06087	8	0	0	0	1	0
V18-06088	8	3		0		0
V18-06141	7	4	4	2	0	0
V18-06143		0	0	2		0
V18-06239	6	4	0	1	1	0
V18-06243	8	4	5	0	2	0
V18-06245	3	2	4	0	3	0
V18-06396_1	3	0	4	0	0	
V18-06396_2	2	2	0	0	0	
V18-06426	8	1	0	0	0	0
V18-06598	3	0	0	0	0	0
V18-06641	6	0	0	0	0	0
V18-06642		0	0	0	0	0
V18-06678	6	2	4	0	1	
V18-06713	3	0	0	0	0	0
V18-06857	6	4	3	2	0	0
Total	124	46	42	15	11	1
Score (Total/n)	5,39	1,84	1,91	0,58	0,52	0,05

n= nombre de prélèvements étudiés pour chaque organe

Un point correspond à un grade de sévérité par type de lésion compatible avec le virus Usutu

Annexe 11 : Tropisme d'organe des cas positifs à USUV en RT-PCR selon le sexe, l'âge et l'espèce

Tropisme d'organe	Mâle	Femelle	Indéterminé
NHS	1	3	4
HS	2	3	3
dont sans cerveau		2	1
N	1	1	
S	3	1	1
dont sans cerveau et sans foie		1	
H sans rate			1
Absence lésion			2

Tropisme d'organe	Juvenile	Adulte	Agé	Indéterminé
NHS	2	1(6a)		5
HS	1	1 (2,3)		6
dont sans cerveau				3
N	2 (4m)			
S	1(1a)	1(4a), 1(5a)	1 (9a)	1
dont sans cerveau et sans foie			1 (9a)	
H sans rate				1
Absence lésion sans rate		1(2a)		1

Tropisme d'organe	Chouette lapone	Merle noir	Chouette de Tengmalm	Grand tétras	Chouette Harfang
NHS	4	3			1
HS	7	1			
dont sans cerveau	3				
N	2				
S	3		1	1	
dont sans cerveau et sans foie			1		
H sans rate	1				
Absence lésion sans rate	1				1

N : tropisme cérébral uniquement ; NHS : tropisme hépatique, splénique et cérébral ; HS : tropisme hépato-splénique ; S : tropisme splénique uniquement, H : tropisme hépatique seulement ; 0 : aucune lésion compatible avec USUV

Annexe 12 : Tableau récapitulatif des tropismes d'organe selon l'espèce, l'âge et le sexe de chaque cas

Numéro de cas	Espèce	Sexe	Age	Pattern
16-6231	Chouette lapone	Mâle	jeune (4 mois)	N
16-6232	Chouette lapone	Femelle	jeune (4 mois)	N
16-6234	Chouette de Tengmalm	Femelle	Agé (9 ans)	S
16-6304	Chouette lapone	Mâle		HS
17-6504	Chouette lapone	Femelle		HS
18-5805	Chouette lapone			HS
18-5921	Chouette lapone	Mâle	adulte (2 ans)	HS
15-6010	Chouette harfang			NHS
18-6044	Chouette lapone			NHS
18-6045	Chouette lapone			H
18-6087	Chouette lapone	Mâle		S
18-6088	Chouette lapone	Femelle		HS
18-6141	Chouette lapone	Femelle	Adulte (6 ans)	NHS
18-6143	Chouette harfang			0
18-6239	Chouette lapone			HS
18-6243	Merle noir	Mâle	jeune	NHS
18-6245	Merle noir			NHS
18-6396	Merle noir		jeune	NHS
18-6396	Merle noir		Jeune	HS
18-6426	Chouette lapone	Femelle		HS
18-6598	Chouette lapone	Mâle	Adulte (4 ans)	S
18-6641	Chouette lapone		Jeune (1 an)	S
18-6642	Chouette lapone		Adulte (2 ans)	0
18-6678	Chouette lapone	Femelle		NHS
18-6713	Grand tétras	Mâle	Adulte (5ans)	S
18-6857	Chouette lapone	Femelle		NHS

N : tropisme cérébral uniquement ; NHS : tropisme hépatique, splénique et cérébral ; HS : tropisme hépato-splénique ; S : tropisme splénique uniquement, H : tropisme hépatique seulement ; 0 : aucune lésion compatible avec USUV

ÉTUDE DES LÉSIONS HISTOLOGIQUES SECONDAIRES À L'INFECTION PAR LE VIRUS USUTU CHEZ LES OISEAUX STRIGIFORMES ET PASSERIFORMES

Auteur

BOISGONTIER Elodie

Résumé

Le virus Usutu (USUV), Flavivirus vectorisé par *Culex spp.* est à l'origine d'épizooties chez les merles noirs (*Turdus merula*) en Europe depuis le début du XXI^e siècle. Cette thèse avait pour objectif de décrire et inventorier les lésions macroscopiques et histologiques consécutives à l'infection par le virus Usutu, ainsi que d'étudier différents facteurs dont l'implication dans le tropisme d'organe était suspectée, mais aussi de confirmer la présence du virus au sein des lésions à l'aide d'immunomarquages.

La première partie de ce travail débute par une synthèse bibliographique sur le virus Usutu et son épidémiologie, puis se poursuit par les connaissances actuelles sur sa pathogénie, les lésions qu'il engendre, ainsi que sur les particularités de l'histologie des oiseaux.

La seconde partie de cette thèse comporte une étude histologique sur 30 individus de six espèces différentes d'oiseaux positifs en RT-PCR USUV, principalement des Strigiformes et des Passeriformes, morts entre 2013 et 2019 en France. L'analyse des lésions observées a montré une atteinte principalement hépatique, splénique et nerveuse, avec des plages de nécrose fibrinoïde, une inflammation mononucléée ou hétérophilique, ainsi qu'une neuronophagie, sans que l'espèce ne semble modifier le tropisme.

Cette étude rétrospective a ainsi permis d'identifier les lésions, de les classer selon leur fréquence, et d'identifier parmi 13 cas non testés en RT-PCR USUV, 7 cas dont les lésions histologiques et les commémoratifs étaient modérément à fortement compatibles avec une infection par le virus Usutu. Si la méthode d'immunohistochimie utilisée mériterait d'être affinée, ces résultats soulèvent cependant la question d'une émergence plus précoce que 2015 du virus Usutu en France.

Mots-clés

virus Usutu, histologie, lésion, immunohistochimie, oiseaux

Jury

Président du jury	:	Pr	MION François
1 ^{er} assesseur	:	Dr	TORTEREAU Antonin
2 ^{ème} assesseur	:	Dr	BRUYERE Pierre
Membre invité	:	Dr	LEMBERGER Karin