



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

This is an author's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/26665>

To cite this version:

Farré, Arnaud. Guide de bonnes pratiques pour les prélèvements biologiques sur la faune sauvage. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2019, 143 p.

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

GUIDE DE BONNES PRATIQUES POUR LES PRELEVEMENTS BIOLOGIQUES SUR LA FAUNE SAUVAGE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

Arnaud FARRÉ

Né, le 19 Février 1995 à Chambéry (95)

Directeur de thèse : Mr Guillaume LE LOC'H

JURY

PRESIDENT :
Mr Gérard CAMPISTRON

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
Mr Guillaume LE LOC'H
Mr Claude PETIT

Maitre de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation ECOLE
NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : Professeur Pierre SANS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1^o CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootechne*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2^o CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*

PROFESSEURS CERTIFIÉS DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAÎTRES DE CONFÉRENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*

Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie- Bactériologie-Pathologie infectieuse*
Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*
Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie - Analgésie*
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales réglementées*
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT CONTRACTUELS

M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et Industrie des aliments*
M. **LEYNAUD Vincent**, *Médecine interne*
Mme **ROBIN Marie-Claire**, *Ophthalmologie*
Mme **ROMANOS Lola**, *Pathologie des ruminants*
M. **TOUITOU Florian**, *Alimentation animale*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

Mme **BLONDEL Margaux**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie-Imagerie médicale*
M. **COMBARROS-GARCIA Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*
M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
M. **LESUEUR Jérémy**, *Gestion de la santé des ruminants – Médecine collective de précision*

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Gérard CAMPISTRON

Professeur des Universités à Toulouse III Paul Sabatier,
Praticien Hospitalier au Centre Hospitalier Universitaire de Purpan
Physiologie et Hématologie

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

Remerciements et hommages respectueux.

A Monsieur le Docteur Guillaume LE LOC'H

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Médecine zoologique et de la faune sauvage

Pour m'avoir proposé ce sujet de thèse

Pour son aide, ses conseils et son soutien, tout au long de ce travail

Trouvez ici le témoignage de toute ma reconnaissance et de toute mon estime.

A Monsieur le Professeur Claude PETIT

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pharmacie et Toxicologie

Qui a très aimablement accepté de faire partie de notre jury de thèse,

Nos remerciements les plus sincères.

Aux docteurs Dominique GAUTHIER, Karine LEMBERGER, Philippe BERNY, Hubert FERTÉ,
Corine NOVELLA, Anouk DECORS et Lorette HIVERT **ainsi que l'ensemble du réseau SAGIR**
pour leur aide précieuse dans la réalisation de cette thèse.

Table des matières :

Table des Annexes :	12
Table des Abréviations :	12
Table des Illustrations :	13
Tableaux :	14
INTRODUCTION.....	15
I PREMIERE PARTIE : ETAT DES LIEUX ET ENJEUX DES PRELEVEMENTS EN FAUNE SAUVAGE :	17
I.1. POURQUOI REALISER UNE AUTOPSIE ET DES PRELEVEMENTS <i>POST-MORTEM</i> SUR UN ANIMAL ISSU DE LA FAUNE SAUVAGE ?	18
I.1.1. Les autopsies en faune sauvage :	18
I.1.1.1 Qu'est-ce qu'une autopsie ?	18
I.1.1.2 Pourquoi faire une autopsie ?	18
I.1.2. Les prélèvements <i>post-mortem</i> en faune sauvage :	19
I.1.2.1 Qu'est-ce qu'un prélèvement ?	19
I.1.2.2 Les prélèvements <i>post-mortem</i> réalisables en faune sauvage :	19
I.1.3. Quel est l'intérêt de réaliser des prélèvements <i>post-mortem</i> en faune sauvage ?	20
I.2. L'ÉPIDÉMIOLOGIE ET LE SUIVI SANITAIRE DE LA FAUNE SAUVAGE FRANÇAISE :	21
I.2.1. L'épidémiologie en faune sauvage :	21
I.2.1.1 Le concept d'épidémiologie :	21
I.2.1.2 Les particularités de l'épidémiologie en faune sauvage :	22
I.2.1.2.1 Intérêt de la faune sauvage pour l'épidémiologie :	22
I.2.1.2.2 Les difficultés de l'épidémiologie de la faune sauvage :	23
I.2.1.2.3 Les grands types de surveillance :	24
I.2.1.3 Présentation des différents acteurs nationaux du réseau d'épidémiologie de la faune sauvage française :	25
I.2.1.4 Le réseau SAGIR :	26
I.3. IMPORTANCE DE LA MISE EN PLACE DE PROTOCOLES PRÉCIS POUR LA RÉALISATION DE PRÉLEVEMENTS <i>POST-MORTEM</i> SUR LA FAUNE SAUVAGE FRANÇAISE :	28
II DEUXIEME PARTIE : LES GRANDS TYPES DE PRELEVEMENTS POST MORTEM ET LEUR RÉALISATION DANS DIFFÉRENTES CONDITIONS :	31
II.1. PRÉSENTATION DES DIFFÉRENTES CONDITIONS D'AUTOPSIE RENCONTRÉES EN PRATIQUE :	32
II.1.1. La situation recherchée : un cadavre frais en laboratoire :	32
II.1.2. Découverte d'un cadavre sur le terrain :	32

II.1.2.1	Transfert possible en laboratoire en condition non optimale :	33
II.1.2.2	Réalisation de prélèvements sur le terrain :	33
II.1.3.	Réception au laboratoire d'un cadavre mal conservé :	34
II.2.	MISE EN ŒUVRE DES GRANDS TYPES DE PRELEVEMENTS EN CONDITIONS IDEALES ET DEGRADEES :	35
II.2.1.	Les prélèvements microbiologiques :	35
II.2.1.1	Les prélèvements bactériologiques :	35
II.2.1.1.1	Quand prélever et jusqu'à quand ?	36
II.2.1.1.2	Condition de conservation du cadavre et prélèvements bactériologique :	36
II.2.1.1.3	Réalisation d'un prélèvement bactériologique en conditions idéales :	37
II.2.1.1.4	Réalisation d'un prélèvement bactériologique en conditions « dégradées » :	38
II.2.1.1.5	Que prélever pour des analyses bactériologiques ?	39
II.2.1.1.6	Comment conserver un prélèvement bactériologique :	39
II.2.1.2	Les prélèvements mycologiques :	40
II.2.1.2.1	Les prélèvements pour les cultures fongiques en conditions idéales :	40
II.2.1.2.2	Les prélèvements pour les cultures fongiques en condition dégradées :	41
II.2.1.2.3	Que prélever pour les analyses fongiques ?	41
II.2.1.2.4	Conservation des prélèvements mycologiques :	41
II.2.1.3	Les prélèvements virologiques :	42
II.2.1.3.1	Les prélèvements virologiques en conditions idéales :	42
II.2.1.3.2	Les prélèvements virologiques en conditions dégradées :	43
II.2.1.3.3	Que prélever pour les analyses virologiques ?	44
II.2.1.3.4	Conservation des prélèvements virologiques :	44
II.2.1.4	Les prélèvements en parasitologie :	45
II.2.1.4.1	Intérêt des prélèvements parasitologiques post-mortem en faune sauvage :	45
II.2.1.4.2	Quels prélèvements post-mortem réaliser en parasitologie sur la faune sauvage et comment les conserver ?	47
II.2.1.4.2.1	Le prélèvement des parasites externes :	47
II.2.1.4.2.2	Les prélèvements de fèces :	48
II.2.1.4.2.3	Le prélèvement des parasites internes :	49
II.2.1.4.2.4	La réalisation d'un frottis sanguin :	50
II.2.2.	Les prélèvements histologiques :	52
II.2.2.1	Intérêts des prélèvements histologiques :	52
II.2.2.2	Comment réaliser un bon prélèvement histologique ?	53
II.2.2.3	Conservation des prélèvements histologiques :	53

II.2.2.3.1	Le formol :.....	53
II.2.2.3.2	Comment conserver et envoyer un prélèvement fixé ?	55
II.2.2.4	Quels prélèvements réaliser en histologie ?	56
II.2.2.4.1	Les organes essentiels à prélever en histologie :	57
II.2.2.4.1.1	Le foie :.....	57
II.2.2.4.1.2	Les reins :	57
II.2.2.4.1.3	La rate :	57
II.2.2.4.1.4	Le cœur :	57
II.2.2.4.1.5	Les poumons :.....	58
II.2.2.4.1.6	Le cerveau :.....	58
II.2.2.4.1.7	Les nœuds lymphatiques :	59
II.2.2.4.2	Les prélèvements situationnels en histologie :	59
II.2.2.4.2.1	Les prélèvements histologiques en cas de signes digestifs :	59
II.2.2.4.2.2	Les prélèvements histologiques sur des jeunes animaux :	60
II.2.2.4.2.3	Le prélèvement histologique du tissu osseux :	61
II.2.2.4.2.4	Le prélèvement histologique du tissu oculaire :.....	61
II.2.2.4.2.5	Les prélèvements histologiques sur des petits individus :	62
II.2.2.5	Devenir des prélèvements histologiques :	62
II.2.2.6	Les artefacts rencontrés en histologie à la suite de mauvais prélèvements :	63
II.2.2.6.1	L'autolyse :.....	63
II.2.2.6.2	La congélation :	64
II.2.2.6.3	La mauvaise fixation :	67
II.2.2.6.4	Les artefacts de sections :	68
II.2.3.	Les prélèvements cytologiques :.....	69
II.2.3.1	Intérêt des prélèvements cytologiques en faune sauvage :.....	69
II.2.3.2	Réalisation des différents prélèvements cytologiques :.....	70
II.2.3.2.1	L'impression :	70
II.2.3.2.2	Le raclage :	71
II.2.3.2.3	La cytoponction à l'aiguille fine :	71
II.2.3.2.4	La cytologie liquide : le frottis :	73
II.2.3.2.5	L'écouvillonnage :	73
II.2.3.3	Conservation des prélèvements cytologiques :.....	73
II.2.4.	Les prélèvements toxicologiques :.....	74
II.2.4.1	Intérêt des examens toxicologiques et signes d'appels :.....	74
II.2.4.2	Les prélèvements toxicologiques en condition idéales :	75
II.2.4.2.1	Que prélever en toxicologie et en quelle quantité ?.....	75

II.2.4.2.2	Le prélèvement du foie pour des analyses toxicologiques :	77
II.2.4.2.3	Les prélèvements de tissu rénal et d'urine pour des analyses toxicologiques :	77
II.2.4.2.4	Les prélèvements sanguins pour des analyses toxicologiques :	78
II.2.4.2.5	Le prélèvement d'humeur vitrée pour des analyses toxicologiques : ...	79
II.2.4.2.6	Les autres prélèvements intéressants pour des analyses toxicologiques :	80
II.2.4.2.7	Les prélèvements à éviter pour des analyses toxicologiques :	80
II.2.4.3	Conservation et envoi des prélèvements toxicologiques :	81
II.2.5.	Les prélèvements en génétique :	82
II.2.5.1	Intérêt des prélèvements génétiques en faune sauvage :	82
II.2.5.2	Les prélèvements <i>post-mortem</i> utiles pour des analyses génétiques : ...	82
II.2.5.2.1	Quels sont les meilleurs prélèvements pour les analyses génétiques ?	82
II.2.5.2.2	Les prélèvements génétiques en condition idéales :	83
II.2.5.2.2.1	Les prélèvements tissulaires pour des analyses génétiques :	83
II.2.5.2.2.2	Les prélèvements sanguins pour des analyses génétiques :	84
II.2.5.2.2.3	Les prélèvements des phanères pour des analyses génétiques : ...	84
II.2.5.2.2.4	Les prélèvements osseux pour des analyses génétiques :	85
II.2.5.2.2.5	Les prélèvements des fèces pour des analyses génétiques :	85
II.2.5.3	Conservation des prélèvements génétiques :	85
II.2.6.	Les prélèvements sanguins :	87
II.2.6.1	Intérêt des prélèvements sanguins pour les analyses <i>post-mortem</i> en faune sauvage :	87
II.2.6.2	Les différentes techniques de prélèvements sanguins en <i>post-mortem</i> : 88	
II.2.6.2.1	Les techniques de prises de sang sur des animaux fraîchement décédés :	88
II.2.6.2.1.1	Les techniques de prises de sang chez les oiseaux :	88
II.2.6.2.1.2	Les techniques de prises de sang chez les mammifères :	91
II.2.6.2.1.3	Les techniques de prises de sang chez les reptiles :	92
II.2.6.2.2	L'extraction de sang du cœur en post-mortem :	95
II.2.6.2.3	L'extraction de sang du sinus cérébelleux :	96
II.2.6.3	Conservation et transfert des prélèvements sanguins :	97
II.2.7.	Les autres prélèvements :	98
II.2.7.1	La sérologie sur « jus de poumon » :	98
II.2.7.2	Le prélèvement de dents :	99
II.2.7.3	Le prélèvement des os :	99
III	TROISIEME PARTIE : REALISATION DES PRELEVEMENTS <i>POST-MORTEM</i> SUR LA FAUNE SAUVAGE EN PRATIQUE :	101

III.1. GUIDES DES PREPARATIFS POUR EFFECTUER DE BONS PRELEVEMENTS SUR LE TERRAIN :	102
III.1.1. Préparation du matériel à emmener sur le terrain pour réaliser des bons prélèvements <i>post-mortem</i> :	102
III.1.1.1 L'équipement « minimal » pour effectuer des prélèvements <i>post-mortem</i> sur le terrain :	102
III.1.1.2 Equipement « secondaire » lors de prélèvement sur le terrain :.....	103
III.1.2. Répartition des tâches lors de la réalisation de prélèvements <i>post-mortem</i> :	104
III.1.2.1 Une répartition des tâches entre personnes « propres » et « habillées » :	104
III.1.2.2 Un rôle particulier : la réalisation de photographies :	105
III.1.3. Rappel des règles de sécurité et de conduite à tenir lors de prélèvements <i>post-mortem</i> :	106
III.2. EVALUATION DE L'ETAT D'UN CADAVRE SUR LE TERRAIN :	108
III.2.1. Evaluation de l'état de conservation d'un cadavre :	108
III.2.1.1 Mécanismes intervenant dans la décomposition d'un cadavre et facteurs favorisants :	108
III.2.1.2 Evaluer l'état de décomposition d'un cadavre en pratique :	110
III.2.2. Evaluation de l'état corporel de l'animal et premier examen externe :	111
III.2.3. Devenir du cadavre :	113
III.3. CHOIX DES DIFFERENTS PRELEVEMENTS <i>POST-MORTEM</i> :.....	113
III.3.1. Suspicion d'une maladie de première ou de deuxième catégorie :	114
III.3.2. Absence de suspicion précise :	114
III.4. TRANSFERT D'UN ENSEMBLE DE PRELEVEMENTS VERS UN OU DES LABORATOIRES D'ANALYSES :	118
III.4.1. Comment bien étiqueter des prélèvements ?.....	118
III.4.2. Transfert des prélèvements du terrain jusqu'à un laboratoire voisin :	119
III.4.3. Transfert de prélèvements vers d'autres laboratoires d'analyses :	120
III.4.4. Transfert de prélèvements dangereux ou susceptibles d'être dangereux : ..	123
III.4.5. Archivage des prélèvements :	124
III.5. DEVENIR DE LA ZONE DE DECOUVERTE DU CADAVRE POST-AUTOPSIE ET ELIMINATION DU CORPS :	125
III.5.1. Principes généraux sur le devenir de la zone de découverte :.....	125
III.5.2. Elimination de la carcasse :.....	126
III.5.3. Désinfection de la zone de découverte et de l'équipe :.....	127
CONCLUSION.....	128
Bibliographie :	129
Annexes :	137

Table des Annexes :

Annexe 1 : Fiche SAGIR :	137
Annexe 2 : Les différents prélèvements environnementaux réalisables en toxicologie de terrain :	138
Annexe 3 : listes de certaines maladies zoonotiques rencontrées lors de la réalisation de prélèvement sur des animaux sauvages :.....	139
Annexe 4 : exemple de matières infectieuses appartenant à la catégorie A de l'OMS :	141

Table des Abréviations :

ADN : Acide désoxyribonucléique

Anses : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ARN : Acide ribonucléique

BCG : Vaccin bilié de Calmette et Guérin

CSC : Conseil Supérieur de la Chasse

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique

ESA (plateforme) : Épidémiosurveillance santé animale

GPS : *Global Positioning System*

OIE : Organisation Mondiale de la Santé Animale ou Office International des Épizooties

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONC : Office National de la Chasse

ONCFS : Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage

PBS : *Phosphate Buffered Saline*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

RT-PCR : *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*

Table des Illustrations :

Figure 1 : différents exemples de carte FTA® :	43
Figure 2 : Etapes de la réalisation d'un frottis sanguin :	51
Figure 3 : Dispositif Biopsafe® :	56
Figure 4 : Image d'autolyse sur une lame histologique d'un intestin de putois :	63
Figure 5 : Image d'autolyse sur une lame histologique d'un rein de chevreuil :	64
Figure 6 : Artefacts dus à la congélation sur une lame histologique d'un poumon de mouflon :	65
Figure 7 : Artefacts dus à la congélation sur une lame histologique d'un foie de buse :	65
Figure 8 : Diagnostic d'une pneumonie vermineuse sur une lame histologique d'un poumon de chevreuil préalablement congelé :	66
Figure 9 : Mauvaise fixation sur une lame histologique de rate de mouton :	67
Figure 10 : Mauvaise fixation sur une lame histologique de rein de buse :	68
Figure 11 : Artéfact de section sur la coupe d'un nœud lymphatique chez un chevreuil :	69
Figure 12 : réalisation d'une lame de cytologie par impression d'organe :	71
Figure 13 : étalement d'un matériel de cytoponction prélevé à l'aiguille fine :	72
Figure 14 : Prélèvement post-mortem d'humeur vitrée chez un bovin :	79
Figure 15 : prélèvement sanguin à la veine jugulaire droite :	89
Figure 16 : prélèvement sanguin à la veine basilaire :	90
Figure 17 : veine médiale metatarsienne, lieu de prélèvement sanguin :	90
Figure 18 : prélèvement sanguin au sinus occipital :	90
Figure 19 : prélèvement sanguin à la veine jugulaire :	91
Figure 20 : prélèvement sanguin à la veine saphène externe :	92
Figure 21 : prélèvement sanguin à la veine coccygienne dorsale :	93
Figure 22 : prélèvement sanguin au plexus veineux sous-nuchal :	93
Figure 23 : prélèvement sanguin à la jugulaire gauche :	94
Figure 24 : prélèvement sanguin à la veine coccygienne ventrale :	95
Figure 25 : prélèvement sanguin au niveau du sinus veineux sur une tête de sanglier, les flèches indiquent la position des sinus sur la coupe transversale de crâne :	96
Figure 26 : Observation de Bacillus anthracis sur un frottis sanguin coloré au Giemsa : ...	112
Figure 27 : indication des prélèvements à réaliser lors d'absence de suspicion clinique et diagnostique :	115
Figure 28 : élément de légende des différents diagrammes de la partie III.3 :	116
Figure 29 : ordre des prélèvements à réaliser sur le tube digestif des animaux sauvages :	117
Figure 30 : exemple de triple emballage pour le transport d'un prélèvement appartenant à la catégorie B :	121
Figure 31 : étiquette pour les matières infectieuses de la catégorie B :	122
Figure 32 : exemple de triple emballage pour le transport d'un prélèvement appartenant à la catégorie A :	123
Figure 33 : Étiquette de danger pour les matières infectieuses de la catégorie A et pour les micro-organismes et les organismes génétiquement modifiés répondant à la définition d'une matière infectieuse, catégorie A :	124

Tableaux :

Tableau 1 : Présentation des différents prélèvements post-mortem réalisables en cas de suspicion d'intoxication :	76
Tableau 2 : Evaluation de l'état de décomposition d'un cadavre sur le terrain :	110

INTRODUCTION

Le terme « Faune sauvage » est employé pour désigner les animaux dits non domestiques selon l'article R*411-5 du code de l'environnement. Les espèces non domestiques sont définies comme n'ayant pas subi de modification par sélection de la part de l'homme (Legifrance, 2007). Ce terme englobe donc plusieurs millions d'espèces. Nous nous concentrerons, ici, sur les oiseaux, les mammifères, les reptiles et les amphibiens de la faune sauvage française.

Lorsque nous nous penchons sur l'origine des maladies émergentes, il apparaît que 60,3% d'entre elles sont dues à des zoonoses. Plus important encore, parmi ces zoonoses, 71,8% sont issues directement de la faune sauvage (Jones et al., 2008). Ainsi, en France, au cours des vingt dernières années, nous avons connu plusieurs épisodes sanitaires qui ont touchés, à la fois, l'économie, la santé animale et la santé humaine. Nous pouvons citer la grippe H1N1 en 2009 ou encore la réémergence de la brucellose chez les bouquetins du massif du Bargy (Hars et al., 2013).

Afin de détecter précocement l'émergence ou la réémergence de maladies infectieuses dans les populations de la faune sauvage, plusieurs institutions ont mis en place des réseaux de surveillance de ces animaux. Au niveau français, le réseau SAGIR, organe de l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage (ONCFS), est l'un des plus performants. Les membres de ce réseau travaillent en étroite collaboration avec les fédérations de chasse ainsi qu'avec les laboratoires d'analyses départementaux et d'autres agents de terrain. L'une de leurs principales missions consiste en la réalisation d'autopsie sur les animaux de la faune sauvage.

Les signes cliniques annonciateurs d'une maladie, potentiellement émergente, peuvent être difficiles voire impossibles à détecter du vivant de l'animal. Toutefois, l'examen *post-mortem* peut amener à certaines suspicions cliniques. Ces dernières nécessitent ensuite une confirmation via des analyses de laboratoires. Pour cela, il est nécessaire d'effectuer des prélèvements sur les cadavres.

Néanmoins, aujourd'hui, il n'existe pas de protocole harmonisé pour la bonne réalisation de ces prélèvements. Cela peut amener, par la suite, à des erreurs de diagnostic ou des incertitudes préjudiciables pour la surveillance des maladies de la faune sauvage.

L'objectif de cette thèse est donc de fournir un guide de bonnes pratiques pour la réalisation de prélèvements *post-mortem* sur les animaux de la faune sauvage. Pour cela, nous nous sommes appuyés sur de nombreux écrits ainsi que sur le réseau SAGIR et des vétérinaires spécialistes des prélèvements en faune sauvage : le Docteur D.Gauthier (Laboratoire

Départementale Vétérinaire et d'Hygiène Alimentaire des Hautes Alpes), le Docteur K.Lemberger (**Laboratoire d'anatomie** pathologique vétérinaire Vet Diagnostics), le Docteur P.Berny (Laboratoire de toxicologie vétérinaire ToxLab), le professeur H.Ferté (Université de Reims Champagne-Ardenne) et le Docteur C.Novella (Laboratoires des Pyrénées et des Landes). Dans un premier temps, nous étudierons la situation et les enjeux des prélèvements dans la faune sauvage française. Ensuite, nous détaillerons les différentes catégories de prélèvements ainsi que leurs conditions de réalisation. Enfin, nous aborderons leur réalisation pratique sur le terrain, ainsi que leurs moyens de conservation et de transport vers des **laboratoires d'analyses**.

I PREMIERE PARTIE : ETAT DES LIEUX ET ENJEUX DES PRELEVEMENTS EN FAUNE SAUVAGE :

I.1. POURQUOI REALISER UNE AUTOPSIE ET DES PRELEVEMENTS *POST-MORTEM* SUR UN ANIMAL ISSU DE LA FAUNE SAUVAGE ?

I.1.1. Les autopsies en faune sauvage :

I.1.1.1 Qu'est-ce qu'une autopsie ?

Le terme autopsie nous vient du grec « autopsia » qui signifie : « voir avec ses propres yeux » (Larousse, 2019). Aujourd'hui, ce terme est employé pour l'examen médical détaillé d'un individu décédé. D'autres mots ou groupes de mots peuvent être utilisés comme synonymes d'autopsie. Ainsi, dans la littérature, nous retrouvons les termes d'examen *post-mortem*, d'examen nécropsique ou de nécropsie.

Une autopsie est divisée en plusieurs parties. La première étape consiste en un examen externe du corps. Puis, à l'ouverture du cadavre, le pathologiste procède à l'examen macroscopique des organes. Enfin, l'examen microscopique, c'est-à-dire à l'échelle cellulaire, est réalisé sur des prélèvements histologiques, et fait partie intégrante d'une autopsie (cf partie II.2.2).

L'autopsie est pratiquée sur les animaux, notamment ceux de la faune sauvage, avec plusieurs objectifs.

I.1.1.2 Pourquoi faire une autopsie ?

La réalisation d'une autopsie vise en premier lieu à orienter sur les causes de la mort du défunt. L'examen minutieux des organes à une échelle dite macroscopique est la première étape pour établir un diagnostic sur la possible pathologie de l'animal. Cependant, hormis des cas présentant des lésions pathognomoniques, c'est-à-dire spécifiques d'une affection donnée, il est nécessaire de réaliser des examens complémentaires pour pouvoir établir un diagnostic.

Le deuxième objectif d'une autopsie est de comprendre et de voir l'anatomie, la physiologie ainsi que les changements induits par la maladie chez une espèce donnée (Terio et al., 2018). C'est grâce aux dissections *post-mortem* que la médecine humaine a fait d'énormes progrès au XVI^{ème} siècle après Jésus-Christ sous l'impulsion de scientifiques comme Léonard de Vinci ou André Vésale. Pour la faune sauvage, l'autopsie est d'autant plus intéressante qu'elle permet de découvrir l'anatomie d'espèces qui sont souvent peu étudiées en pratique. L'intérêt est ensuite de transposer ce savoir pour pouvoir comprendre et soigner des animaux vivants.

Enfin, aujourd'hui, chez l'homme, au terme d'autopsie est souvent associé l'adjectif médico-légal. En effet, la nécropsie a souvent pour but de déterminer les causes et circonstances de la mort d'un individu lorsque celle-ci est intervenue dans des circonstances suspectes, violentes ou inexplicables. Cet aspect de l'autopsie peut également être appliqué au domaine vétérinaire lorsqu'un crime ou un accident sont suspectés. Cette autopsie dite judiciaire est ordonnée par un procureur de la république ou un juge d'instruction et est, si possible, effectuée par un vétérinaire pathologiste de formation. En faune sauvage, ces démarches sont relativement fréquentes car les animaux peuvent par exemple être exposés, de manière non intentionnelle ou au contraire criminelle, à des substances toxiques. D'autres individus peuvent être victime de braconnage. L'autopsie visera alors à déterminer la date de la mort, sa cause, s'il y a eu intervention d'un tiers (...) et aura recours, si nécessaire, à des prélèvements *post-mortem*, pour arriver à une conclusion (Arboucalot, 2017).

I.1.2. Les prélèvements *post-mortem* en faune sauvage :

I.1.2.1 Qu'est-ce qu'un prélèvement ?

Nous pouvons nous appuyer sur la définition du mot « prélever » dans le dictionnaire Larousse. Il est défini comme suit : « Extraire une partie d'un tout, en particulier pour l'analyser » (Larousse, 2019). Le « tout », ici, représente le cadavre duquel nous souhaitons retirer certains éléments (liquides corporels, organes...) afin de les soumettre à des examens complémentaires.

Toutefois, le « tout » peut également représenter l'environnement dans lequel se trouve le corps que nous souhaitons autopsier. Dans ce cas, l'action de prélever prendra sens lorsque nous transporterons ce corps dans un laboratoire pour l'analyser et pratiquer un examen *post-mortem*.

Ces deux sens du mot prélèvement seront donc utilisés dans ce guide de bonnes pratiques.

I.1.2.2 Les prélèvements *post-mortem* réalisables en faune sauvage :

En faune sauvage, lorsque les animaux sont vivants, il convient d'établir une distinction entre deux grands types de prélèvements : invasifs et non invasifs. Ces premiers peuvent être problématiques car ils peuvent entraîner des lésions chez les individus prélevés ou, au moins, provoquer un stress important. Il est donc important de sélectionner les prélèvements pratiqués afin de diminuer leur caractère invasif.

Toutefois, cette notion disparaît complètement en *post-mortem* et cela nous ouvre de nouvelles opportunités. En effet, alors qu'il paraissait inconcevable d'ouvrir un animal vivant pour prélever un organe sans raison apparente, cet acte est tout à fait possible sur un animal mort, s'il rentre dans le cadre d'une étude ou pour une autopsie. De manière plus générale, de nombreux prélèvements sont possibles chez un animal décédé. Les organes sont plus facilement accessibles et donc plus simples à prélever. Cependant, l'effet inverse est constaté pour certains liquides biologiques comme le sang. En effet, ce dernier coagule rapidement après la mort et les ponctions classiques donnent de moins bons résultats sur un cadavre. Il est donc nécessaire d'adapter nos prélèvements au cadavre, notamment selon son état de fraîcheur ou de décomposition (cf partie III.2.1). Certaines prises d'essai ne seront possibles que sur des animaux fraîchement décédés alors que d'autres seront réalisables sur des cadavres fortement dégradés.

I.1.3. Quel est l'intérêt de réaliser des prélèvements *post-mortem* en faune sauvage ?

Un des premiers intérêts des prélèvements lors d'une autopsie est de pouvoir réaliser un diagnostic. La plupart du temps, après une autopsie, nous suspectons une ou plusieurs causes. Nous parlerons alors de cause probable, c'est-à-dire qu'elle « repose sur des critères cliniques et demande une confirmation par un diagnostic de laboratoire » (Dufour et al., 2011). C'est ce dernier qui va permettre le passage à un cas « certain ». Après exploitation en laboratoire, les prélèvements nous permettent d'arriver à un diagnostic de certitude. Si ce n'est pas le cas, ils contribuent tout de même à affiner nos hypothèses et font partie intégrante de notre réflexion diagnostique.

Les prélèvements sont également essentiels à la valorisation scientifique. Ils permettent d'étayer certain cas tout en replaçant les éléments dans un contexte plus large. Par exemple, la présentation d'un cas clinique n'a que peu de valeur si elle n'est pas accompagnée d'examens complémentaires confirmant ou orientant le diagnostic.

En outre, les prélèvements réalisés sur les animaux sauvages peuvent servir à l'amélioration des connaissances sur une espèce donnée. En effet, plusieurs d'entre elles sont mal connues et les analyses pratiquées sur les prélèvements permettent de combler des manques de connaissances dans de nombreux domaines. Cela contribue également à la collecte de données, dites de référence, qui serviront à évaluer et mieux comprendre de futurs cas, vivants ou morts.

Enfin, les prélèvements *post-mortem* réalisés sur des animaux sauvages sont un support important de la surveillance épidémiologique.

I.2. L'ÉPIDÉMIOLOGIE ET LE SUIVI SANITAIRE DE LA FAUNE SAUVAGE FRANÇAISE :

I.2.1. L'épidémiosurveillance en faune sauvage :

I.2.1.1 Le concept d'épidémiosurveillance :

La surveillance est « l'action de surveiller, c'est-à-dire d'observer attentivement quelque chose ou quelqu'un pour les contrôler » (Larousse, 2019). Pendant des années, le contrôle des maladies s'est exercé via la surveillance des individus placés en quarantaine. Puis le concept a changé dans les années 1950, grâce au Docteur A.D Langmuir qui prône un passage de la surveillance d'un individu à la surveillance de la dynamique des maladies dans la population. Le concept évolue encore dans les années 1980, vers une surveillance de la santé publique. L'idée est alors d'effectuer une collecte systématique, organisée et continue des données de santé. Leur analyse permet alors d'adapter et d'orienter la politique en termes de santé public, l'objectif étant d'informer pour agir (Dufour et al., 2011).

L'épidémiosurveillance est définie comme « une méthode fondée sur des enregistrements en continu permettant de suivre l'état de santé ou les facteurs de risque d'une population définie, en particulier de déceler l'apparition de processus pathologique et d'en étudier le développement dans le temps et dans l'espace, en vue de l'adoption de mesures appropriées de lutte » (Toma et al., 2010). C'est une méthode efficace qui est appliquée dans de nombreux pays, notamment en France.

Les objectifs de la surveillance épidémiologiques sont les suivants (Dufour et al., 2011) :

- **Détecter l'arrivée et l'expression d'une maladie exotique** ou nouvelle dans une région donnée, et lutter contre celle-ci précocement et efficacement. C'est ce que nous appelons l'épidémiovigilance.
- **Etablir une hiérarchie dans l'importance économique ou sanitaire** entre plusieurs maladies présentes dans une même population, et ainsi déterminer des actions prioritaires pour y remédier.
- **Déterminer l'importance réelle d'une maladie en termes d'incidence, de prévalence ou de pertes économiques...** et suivre l'évolution de cette maladie afin d'établir ou non un plan de lutte adaptée (ou de modifier le plan actuel).
- **Evaluer l'efficacité d'un plan de lutte** en suivant la décroissance de la maladie ciblée.
- **Susciter des hypothèses** qui seront explorées par des méthodes de recherches analytiques ou expérimentales.

Voyons maintenant comment cette définition de l'épidémiosurveillance et les objectifs établis ci-dessus s'accordent lorsqu'il s'agit de surveiller la faune sauvage française.

1.2.1.2 Les particularités de l'épidémiosurveillance en faune sauvage :

1.2.1.2.1 Intérêt de la faune sauvage pour l'épidémiosurveillance :

Tout d'abord, au niveau international, l'Organisation mondiale de la santé animale (ou Office Internationale des Épizooties, OIE) apporte des premiers éléments de réponses. Dans la résolution XXI du 28 mai 2009 *Impact of the climate changes and environmental changes on emerging and re-emerging animal diseases and animal production*, l'organisation place la faune sauvage comme une sentinelle privilégiée de l'épidémiosurveillance. En effet, « la faune sauvage est en interrelation étroite avec les maladies animales et humaines et constitue un révélateur précoce » (Gauthier et al., 2016). Dès 2009, l'OIE invitait donc ses états membres à prendre la faune sauvage en compte dans leurs systèmes de surveillance épidémiologique. Cela fut mis en place en France en 2013 avec la création d'un groupe en charge du suivi de la faune sauvage au sein de la plateforme d'épidémiosurveillance en santé animale (ESA) (ESA, 2019).

Il y a cinq raisons principales pour lesquelles la faune sauvage constitue une sentinelle essentielle en épidémiosurveillance (Warns-Petit et al., 2009) :

1. Les animaux sauvages sont en contact direct et indirect avec des animaux d'élevage, que ce soit du bétail ou des volailles dites domestiques. Ce contact peut être à l'origine de la transmission d'agents pathogènes responsables de maladies d'importance économique et sanitaire parfois majeure. Les exemples sont nombreux : la tuberculose (Delahay et al., 2001), les pestes porcines classique (Rossi et al., 2006) et africaine...
2. Les animaux sauvages peuvent également rentrer en contact avec des animaux domestiques et transmettre ou être contaminés par certains pathogènes. Même si ces cas sont moins bien documentés, il en existe un certain nombre qu'ils soient parasitaires (Mackenstedt et al., 2015) ou microbiologiques (Williams, Barker, 2001).
3. Les animaux sauvages sont porteurs d'agents pathogènes responsables de zoonoses graves chez l'homme. Nous pouvons citer la rage vulpine, la borréliose de Lyme, les encéphalites à tiques, l'échinococcose multiloculaire...
4. Les animaux sauvages sont également en contact avec certains agents biologiques, chimiques ou toxiques. Ces contacts sont souvent des conséquences de la pollution agricole, industrielle voire urbaine. Le développement de symptômes ou de maladies à la suite de ces expositions est préoccupante. Les animaux sauvages agissent donc

comme sentinelles de la pollution environnementale et fournissent des informations sur l'exposition possible de l'homme et des animaux domestiques à ces menaces. Ainsi, Baos *et al.*, ont mis en évidence une forte exposition aux métaux lourds chez les cigognes de la région de Séville à la suite d'un ancien incident minier. Cette contamination environnementale pourrait également être dangereuse pour l'homme (Baos et al., 2006).

5. Certaines maladies, surtout si elles sont émergentes, peuvent entraîner la raréfaction voire la disparition locale de certaines espèces. La mortalité importante de l'écureuil roux en Europe due à une infection par le *Squirrelpox virus* en est un exemple récent (Sainsbury et al., 2000 ; Chantrey et al., 2014).

Par ailleurs, en France comme dans de nombreux pays européens, le risque d'apparition et de persistance de maladies dans la faune sauvage a augmenté. Ce risque va de pair avec l'accroissement démographique de certaines espèces comme des rongeurs, des carnivores ou de manière plus impressionnante encore, des grands ongulés. Ainsi, le Cerf élaphe, le Sanglier et le Chevreuil ont vu leurs effectifs augmenter de près de 400% ces quinze dernières années sur le territoire français (Hars, Rossi, 2009).

1.2.1.2.2 Les difficultés de l'épidémiologie de la faune sauvage :

La surveillance épidémiologique de la faune sauvage est un travail difficile qui présente des particularités. Nous avons listé quelques-unes de ses difficultés :

- Les animaux de la faune sauvage sont farouches. Ils sont difficiles à localiser, à observer, et à manipuler lors de captures.
- Les estimations d'effectifs des différentes espèces de la faune sauvage sont souvent approximatives. Elles sont obtenues par exemple à partir des prélèvements cynégétiques pour les espèces chassées. Pour les autres, elles sont estimées lors d'études par exemple par des méthodes de capture-recapture (Dabis, Desenclos, 2017). Ces estimations, souvent ponctuelles, ne tiennent pas toujours compte des variations saisonnières liées à la reproduction, aux périodes de chasses, aux pratiques agricoles...
- La surveillance épidémiologique de la faune sauvage pâtit du syndrome dit de « l'iceberg » (Hars, Rossi, 2009). En effet, les enquêtes et études effectuées sur les animaux sauvages sont très souvent réalisées sur des échantillons restreints, parfois peu représentatifs de la population.
- La détection des animaux morts est souvent aléatoire. Il existe donc un biais de collecte qui rend certains résultats, obtenus par la suite, difficilement extrapolables à certaines populations. En effet, certains animaux sont plus facilement découverts, et ce pour différentes raisons : taille de l'individu, distance du cadavre par rapport aux

habitations ou à des lieux passants, saison... (Keller, 2008). Ainsi, chez les animaux de petites tailles ou difficiles à trouver dans le milieu naturel, une mortalité importante peut passer inaperçue. Ce fut le cas pour plusieurs espèces d'amphibiens, décimées par un agent fongique (*Batrachochytrium dendrobatidis*) dont l'augmentation de mortalité n'a été objectivée que tardivement (Morner et al., 2002). En outre, la détection des animaux morts dépend du type de surveillance de la faune sauvage. Ainsi, le pourcentage de cadavres découverts varierait de 3% dans le cas de surveillance passive à 50% au maximum pour une surveillance active (Gibert, 2018).

- Les maladies qui touchent la faune sauvage sont très diversifiées et les biologistes et vétérinaires peuvent se heurter à une méconnaissance de certaines pathologies (Warns-Petit et al., 2009).

1.2.1.2.3 Les grands types de surveillance :

Pour réaliser l'épidémiologie de la faune sauvage, il existe plusieurs grandes méthodes, nous allons en décrire brièvement certaines :

- **La surveillance fondée sur l'analyse de risque** : cette surveillance établit des priorités sur les dangers, que ce soient des maladies ou des agents pathogènes, sur les populations (donc sur les effectifs à échantillonner), sur les lieux et sur les tests diagnostiques à utiliser pour avoir une confiance suffisante dans la probabilité de détecter un événement (McKenzie et al., 2007). Cette surveillance spécifique est applicable en faune sauvage. Ainsi, en 2006, elle a été utilisée pour cartographier les zones humides d'Europe afin de maximiser les chances d'observation d'oiseaux sauvages potentiellement porteurs de virus influenza aviaire (Warns-Petit et al., 2009).
- **La surveillance sentinelle** : c'est une surveillance active ciblée sur certaines maladies ou événements de santé non soumis à déclaration obligatoire. Ce n'est donc pas une surveillance exhaustive puisqu'elle s'intéresse à un indicateur dans une population donnée. Généralement, les données sont collectées par des professionnels de la santé sur des intervalles de temps réguliers. Ensuite, à partir de ces données, des estimations sont réalisées pour une population beaucoup plus large (Dabis, Desenclos, 2017). Les animaux sauvages peuvent faire partie des populations observées. En effet, ils sont plus exposés ou plus sensibles que les humains à l'action de certains agents pathogènes ou polluants (Warns-Petit et al., 2009). Ce type de surveillance est intéressante car elle requiert moins de ressources puisque le nombre de personnes recueillant les informations est réduit. De ce fait, ce personnel est mieux formé et les données recueillies de meilleure qualité (Dabis, Desenclos, 2017).

- La surveillance syndromique : **c'est une surveillance non spécifique, c'est-à-dire non orientée sur une maladie en particulier.** Elle peut être événementielle ou planifiée (Dufour et al., 2011). Le *Center for Diseases Control and Prevention* la définit comme : « Une approche, dans laquelle les intervenants sont assistés par des procédures **d'enregistrement automatiques des données, qui permettent la mise à disposition de données pour le suivi et l'analyse épidémiologique en temps réel ou proche du temps réel.** Cela permet de détecter des événements habituels ou **inhabituels plus tôt qu'il n'aurait été possible de le faire sur la base des méthodes traditionnelles de surveillance** ». En faune sauvage, les syndromes peuvent par exemple correspondre **à l'ensemble des lésions apparaissant de manière concomitante sur certains organes chez des animaux sauvages** (Gauthier et al., 2016). Nous parlons de « syndrome » car ces lésions peuvent avoir des causes **diverses et sont indépendants d'une espèce donnée** (Warns-Petit et al., 2009). Une fois collectées, ces données syndromiques peuvent alors être traitées et interprétées par des organismes nationaux de surveillance de la faune sauvage.

Pour mettre en place ces surveillances, il est nécessaire d'avoir des acteurs qui travaillent à plusieurs niveaux.

1.2.1.3 Présentation des différents acteurs nationaux du réseau d'épidémiosurveillance de la faune sauvage française :

Il y a toujours **quatre étapes dans un réseau d'épidémiosurveillance** (Dufour et al., 2011), nous les avons listées, ainsi que les différents acteurs qui y participent dans le cadre de l'épidémiosurveillance de la faune sauvage française :

- La collecte des données : dans le cas qui nous intéresse, les données correspondent aux cadavres des animaux sauvages **ainsi qu'aux prélèvements *post-mortem* qui sont effectués sur ces animaux.** Ils sont collectés par des agents de l'ONCFS, des membres de la Fédération Départementale des Chasseurs (FDC) du département où se trouve l'animal ou des agents des laboratoires départementaux (Terrier et al., 2006).
- La centralisation et la validation des données : une fois les données collectées, il faut **s'assurer qu'elles sont exactes et qu'elles peuvent être intégrées dans une base de données sans créer de biais ou d'erreurs d'interprétations ultérieures** (Dufour et al., 2011). Cette validation est souvent réalisée par une personne habilitée qui occupe un **poste de superviseur des agents de terrain, que ce soit à l'ONCFS ou dans un laboratoire départemental.** Il existe également une double validation effectuée à l'échelon central (ou national).

- **La gestion et l'analyse des données** : C'est la dernière étape avant la prise de décision par les responsables de la santé animale. Elle comprend la centralisation des données puis leurs manipulations et leurs analyses avant une présentation des résultats obtenus aux décideurs. En faune sauvage, cette étape est en réalité divisée en deux parties : **une première étape d'examen des prélèvements**, au sein des laboratoires **d'analyses** départementaux, ainsi que dans des laboratoires spécialisés si nécessaire ; puis une seconde, au sein de services de centralisation des données comme les DDPP (Direction Départementale de la Protection des Populations) ou **l'Anses** (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail). Ces organismes peuvent décider de pratiquer certaines analyses **supplémentaires pour affiner certaines données et conclusions**, d'où l'importance de conserver certains échantillons sur le long terme.
- **La diffusion de l'information** : c'est une étape essentielle qui valorise les données et les informations produites par le réseau de surveillance. Elle permet également de renforcer la motivation de tous les acteurs du réseau. Il y a deux types de diffusions, une interne, pour les différents acteurs du réseau, et une externe, qui vise les partenaires nationaux et internationaux du réseau (Dufour et al., 2011). En faune **sauvage française**, l'un des moyens de diffusion de l'information est le bulletin épidémiologique santé animale - **alimentation réalisé par l'Anses** et la DGAL (Direction générale de l'alimentation) depuis 2001.

1.2.1.4 Le réseau SAGIR :

En France, le suivi sanitaire de la faune sauvage a fait rapidement partie des préoccupations des instances nationales. Ainsi, dès 1955, le Conseil Supérieur de la Chasse (CSC) a mis en place une enquête sur les causes de mortalité du gibier avec un accent particulier sur les intoxications dues aux pesticides (Chenesseau, 2011). **Lors de la création de l'Office Nationale de la Chasse (ONC) à partir du CSC en 1972**, cette enquête fut poursuivie sous la formule « enquête sur la mortalité anormale du petit gibier ». Le but de cette dernière était de **détecter précocement l'émergence d'une maladie potentiellement contagieuse ou d'une épidémie et également de juger de l'impact de certaines maladies sur le petit gibier**. Pour se faire, **l'ONC a fait pratiquer des analyses** par plusieurs laboratoires, sur des cadavres découverts dans la nature par des gardes fédéraux. **Chaque cadavre était accompagné d'une fiche remplie par le garde** (Mallet et al., 1986). Cette enquête a permis de mettre en évidence **les principaux agents pathogènes à l'origine de la mortalité des lièvres sur le territoire français**. Elle a également permis de **poser les fondations, en 1986, d'un réseau** de surveillance sanitaire national de la faune sauvage, au sein duquel les données seraient centralisées,

organisées et analysées avec des objectifs précis. Ce réseau appelé « SAGIR » ou « surveiller pour agir », **géré par l'ONC, devenu ONCFS (Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage)** en 2000, est en partenariat constant avec la Fédération Nationale des Chasseurs.

Le réseau SAGIR a quatre objectifs principaux (Decors et Mastain, 2010) :

- Caractériser de manière spatio-temporelle les différentes maladies touchant les oiseaux et mammifères sauvages et ayant un enjeu pour la santé des populations.
- **Détecter de manière précoce l'émergence de nouvelles maladies dans la faune sauvage ou au moins nouvelles pour la faune sauvage.**
- **Surveiller les effets aigus non intentionnels de l'utilisation de produits phytosanitaires et phytopharmaceutiques par les professionnels de l'agriculture sur les animaux de la faune sauvage.**
- Recenser et connaître les agents pathogènes zoonotiques de la faune sauvage, et ainsi évaluer les risques de transmission tout en adaptant la protection des populations, en particulier des chasseurs.

Pour mener à bien ses missions, **le réseau SAGIR s'appuie** sur la détection de la mortalité des oiseaux et des mammifères sauvages et la détermination de son étiologie. Ceci est possible grâce à un **travail d'observation et de collecte réalisé par les inspecteurs de l'environnement** et techniciens des fédérations départementales des chasseurs. Ainsi, chaque année, entre 2500 et 3500 animaux, malades ou morts, sont découverts puis analysés par les membres du réseau (Decors et Mastain, 2010) . Pour les cadavres, **l'analyse**, pratiquée par les **laboratoires d'analyses départementaux**, comprend systématiquement une autopsie et, éventuellement, des examens complémentaires pour préciser et confirmer le diagnostic nécropsique. **Chaque corps est accompagné d'une fiche SAGIR** (cf Annexe 1) remplie lors de la collecte de l'animal. Elle suit le corps de l'animal lors de la réalisation de l'autopsie et les prélèvements lors de la réalisation d'**examens complémentaire dans** des laboratoires **externes**. **L'ensemble des fiches et des données ainsi obtenues sont** ensuite centralisées, analysées puis exploitées au niveau national (Terrier et al., 2006).

I.3. IMPORTANCE DE LA MISE EN PLACE DE PROTOCOLES PRECIS POUR LA REALISATION DE PRELEVEMENTS POST-MORTEM SUR LA FAUNE SAUVAGE FRANÇAISE :

Selon Dufour *et al.*, la qualité des résultats d'une étude ne dépend pas seulement de l'analyse proprement dite mais également d'autres paramètres (Dufour et al., 2011). Parmi ces derniers, certains nous intéressent particulièrement :

- La formation des agents.
- Le respect des procédures opératoires lors des différentes étapes de prélèvements et d'analyses.
- La vérification du matériel, du contrôle et de l'enregistrement des analyses.

Si ces paramètres ne sont pas maîtrisés, les prélèvements réalisés dans le cadre d'une autopsie d'un animal sauvage, seront difficilement exploitables. L'objectif de cette étude est donc de fournir un outil aux agents de terrains afin qu'ils réalisent les meilleurs prélèvements possibles, avec le meilleur matériel possible dans les meilleures conditions.

Par ailleurs, comme expliqué précédemment, nous ne voyons qu'une infime partie des cadavres des animaux de la faune sauvage. Nous pratiquons donc des prélèvements sur un échantillon souvent non représentatif de la population. Nous pouvons alors parler de biais de collecte. Il est malheureusement difficile de le réduire car il dépend de nombreux paramètres que nous ne pouvons pas maîtriser (présence de prédateurs, localisation géographique des cadavres par rapport à des lieux passants...).

En revanche, il existe certains biais dont nous pouvons tenter de réduire l'influence et la prévalence. Nous pouvons citer l'exemple des biais de mesures ou d'informations. Ces derniers sont définis comme « regroupant toutes les erreurs systématiques qui peuvent s'introduire dans la mesure des phénomènes pris en compte chez les sujets » (Aegerter, Goldberg, 2009). A notre échelle, plus les agents réalisent des bons prélèvements et plus ces biais diminuent.

Pour réaliser un bon prélèvement en autopsie sur un animal de faune sauvage, il faut à la fois réaliser un prélèvement pertinent tout en ayant une méthode de prélèvement correcte. Ainsi, il faut savoir quel élément prélever, se questionner ou connaître le but et l'utilisation de cet échantillon. De plus, il est nécessaire d'utiliser les bonnes méthodes de prélèvement. Par exemple, un prélèvement servant pour une analyse bactériologique doit être effectué de manière stérile, sinon les données seront inexploitables ou faussées.

En outre, pour diminuer les biais de mesures dans les étapes précédents l'analyse des données prélevées sur le terrain, il est important de savoir dans quelles conditions conserver puis transporter les échantillons. En effet, si celles-ci sont inappropriées, les données pourraient perdre en valeurs voire être inexploitable.

Enfin, dans le but d'exploiter les différentes données obtenues lors des prélèvements et de leurs analyses, il est nécessaire d'harmoniser le plus possible l'étape de collecte et de prélèvement. Ainsi, les données seront homogènes et comparables donc susceptibles d'être intégrées à une ou des bases de données exploitables.

L'objectif des parties suivantes est donc d'apporter des éléments visant à minimiser les biais de mesures. Pour cela, nous fournissons des informations sur les protocoles de collecte de nombreux types d'échantillons, tout en précisant les conditions de transport et de conservation.

II DEUXIEME PARTIE : LES GRANDS TYPES DE PRELEVEMENTS *POST-MORTEM* ET LEUR REALISATION DANS DIFFERENTES CONDITIONS :

II.1. PRESENTATION DES DIFFERENTES CONDITIONS D'AUTOPSIE RENCONTREES EN PRATIQUE :

Ici, nous nous concentrons sur quatre situations possibles, tout en soulignant que la quatrième doit être rencontrée le moins possible, notamment si les acteurs suivent les recommandations de ce guide.

II.1.1. La situation recherchée : un cadavre frais en laboratoire :

Il s'agit de la situation idéale pour réaliser des prélèvements *post mortem* en faune sauvage. En effet, avoir un cadavre frais permet de pratiquer l'autopsie la plus complète possible tout en étant dans les conditions les moins dégradées. Cela permet donc d'avoir des prélèvements de première qualité si ces derniers sont bien effectués.

Par ailleurs, pratiquer l'autopsie et les prélèvements *post mortem* dans un laboratoire permet de limiter les contaminations externes, tout en travaillant dans un environnement standardisé qui n'est pas soumis aux variations climatiques. De plus, si une maladie zoonotique est suspectée, travailler en laboratoire, notamment sous hôte, est fortement recommandé (cf partie III.1.3).

II.1.2. Découverte d'un cadavre sur le terrain :

Lorsque nous trouvons un cadavre sur le terrain, il convient d'évaluer sa fraîcheur (comme nous le décrivons dans la partie III.2.1, se rapporter au tableau 3) et son état de décomposition. Si celui-ci est encore frais et si un transfert rapide (c'est-à-dire dans les 48 heures) en laboratoire (ou dans tout autre lieu permettant une autopsie standardisée et sécurisée) est possible, nous nous trouvons dans la situation décrit en II.1.1.

Toutefois, la plupart des cadavres découverts sur le terrain ne rentrent pas dans cette catégorie. En effet, nous pouvons rencontrer plusieurs problèmes :

- a) le transfert du cadavre est impossible dans les 48 heures notamment à cause de problèmes logistiques, de l'éloignement du cadavre ou du laboratoire, d'une découverte du cadavre le week-end...
- b) le transfert du cadavre est impossible vu le format de l'animal (un cerf est plus difficile à transporter qu'un lièvre), la saison (l'hiver n'est pas propice au transport des animaux notamment dans les lieux enneigés) ou si nous suspectons une maladie zoonotique très contagieuse...
- c) Le cadavre n'est plus frais et son état de décomposition est tel qu'un transfert en laboratoire est illusoire

II.1.2.1 Transfert possible en laboratoire en condition non optimale :

Dans cette partie nous nous plaçons dans la situation a) décrite précédemment. Si le transfert du cadavre est impossible dans les 48 heures, une des solutions que nous préconisons est de congeler le corps. La congélation permet de conserver un nombre important **d'informations tout en permettant de stopper les mécanismes d'autolyse et de putréfaction** (cf partie III.2.1.1). Par ailleurs, congeler un corps nous laisse la possibilité de réaliser de nombreuses analyses supplémentaires sur les échantillons prélevés sur ce dernier. Ainsi, les cultures bactériologiques, fongiques et virales, les *Polymerase Chain Reaction* (PCR), **l'identification de la plupart des parasites et les analyses toxicologiques** sont possibles sur cadavre congelé (Viner, 2015). Cependant, cet acte présente également des inconvénients (Terio et al., 2018) car il y a une perte de données non négligeable :

- Altération de la couleur des tissus ;
- **Formation d'artéfacts liés à la décongélation, similaires à des hémorragies qui rendent l'interprétation de l'autopsie plus difficile ;**
- Formations de cristaux de glaces qui sont problématiques pour la lecture ultérieure des prélèvements histologiques (cf partie II.2.2.6.2) ;
- Destruction de certains agents bactériens et fongiques (comme *Pasteurella* spp).

Ainsi, en laboratoire lorsque nous voulons réaliser des prélèvements, travailler sur des cadavres préalablement congelés pose surtout un problème pour la partie histologique. Les autres grandes catégories de prélèvements sont très faiblement impactées par la congélation.

En ce qui concerne les différents moyens de congélation possibles, Terio *et al.* conseillent **d'utiliser en ordre de priorité l'azote liquide, la congélation à -80°C**, puis la glace carbonique et enfin en dernier lieu la congélation à **-20°C**. Cependant, l'expérience montre que cette dernière est amplement suffisante pour conserver un **maximum d'informations pendant une période minimale de deux mois**. Il est toutefois **important de s'assurer que le congélateur utilisé ne fonctionne pas par cycles de gel-dégel** qui seraient grandement néfastes pour la viabilité des échantillons (Terio et al., 2018).

II.1.2.2 Réalisation de prélèvements sur le terrain :

Dans cette partie nous nous plaçons dans le cadre des situations b) et c). La réalisation de prélèvement sur le terrain reste également une alternative à la congélation. En effet, si des prélèvements sur le terrain sont possibles, cela permet de conserver un **maximum d'informations notamment en pour l'histologie**. Enfin, dans le cadre d'animaux prélevés directement après une mise à mort (notamment pour les actes de chasse légale), les prélèvements sur le terrain constituent une plus-value importante. Effectivement, certains ne

sont possibles que dans les minutes qui suivent la mort de l'animal notamment les prises de sang ainsi que l'extraction de la moelle osseuse.

La réalisation d'un prélèvement sur le terrain nécessite une organisation préalable décrite dans la partie III.1.2. Une fois les prélèvements réalisés, ils peuvent être envoyés dans un ou plusieurs laboratoires ou centres de traitement.

II.1.3. Réception au laboratoire d'un cadavre mal conservé :

Il s'agit de la dernière situation, celle qui est la moins intéressante en laboratoire. En effet, si la conservation du corps est mauvaise, l'autopsie est difficile et les conclusions ont moins de valeurs. De plus, les prélèvements sont beaucoup plus compliqués et leur exploitation peut s'avérer non conclusive.

La mauvaise conservation d'un cadavre favorise les mécanismes d'autolyse et de putréfaction. Comme nous l'expliquons dans la partie III.2.1.1, ces mécanismes favorisent la prolifération de micro-organismes commensaux ou provenant d'une contamination environnementale. En outre, d'autres micro-organismes comme certains virus enveloppés sont fragiles et ne supportent pas des mauvaises conditions de conservation. Nous pouvons notamment citer les *Flaviridae*, les *Anterividae*, ou certains *Herpesviridae* (Markey, 2013).

Ce changement dans la population de micro-organismes peut complètement modifier les résultats des tests effectués par la suite sur les prélèvements et ainsi fausser nos conclusions nécropsiques.

En ce qui concerne le phénomène d'autolyse, c'est-à-dire la digestion des tissus par les enzymes lysosomales (McDonough, Southard, 2017), plus elle est poussée et plus les prélèvements sont difficiles à interpréter. En effet, une confusion entre artefacts et vraies lésions, que ce soit aux niveaux macroscopiques ou microscopiques, est alors possible (cf partie II.2.2.6.1).

Ainsi, un corps doit idéalement être conservé à une température de +4°C, ou congelé à défaut, pendant le transport au laboratoire. Nous expliquons en détails les modalités de transport dans la partie III.4.

II.2. MISE EN ŒUVRE DES GRANDS TYPES DE PRELEVEMENTS EN CONDITIONS IDEALES ET DEGRADEES :

Une fois les différentes conditions de prélèvements citées, abordons maintenant les différentes catégories de prélèvements et leur réalisation dans deux grands cas de figures :

- **Les conditions dites idéales, c'est-à-dire** sur un cadavre frais, en laboratoire ou sur le terrain.
- **Les conditions dites dégradées, c'est-à-dire** sur un cadavre qui a été congelé ou qui mal conservé. Nous incluons également dans cette partie des méthodes de **prélèvements qui permettent d'obtenir des données** sans utiliser trop de matériel organique.

Toutefois, il peut arriver que certains prélèvements soient pratiquement impossibles à réaliser en condition dégradées (histologie, prélèvement sanguin). *A contrario*, **d'autres sont réalisables** quelques soient les conditions (générique, toxicologie). Dans ce dernier cas précis, **nous n'emploierons pas les termes** de « condition idéales » et « dégradées ».

II.2.1. Les prélèvements microbiologiques :

Les prélèvements microbiologiques en faune sauvage regroupent les prélèvements bactériologiques, virologiques, parasitologiques et fongiques. Les analyses qui suivent ces prélèvements font partie des plus assujetties à la variabilité. En effet, **contrairement à d'autres analyses comme l'histologie où la variabilité est uniquement** opérateur dépendante, ici, elle dépend principalement de la qualité des prélèvements et des cultures ou autres procédés diagnostiques (PCR, sérologie, agglutination sur lame...) **qu'ils permettent. Un mauvais** prélèvement ne pourra pas donner de bonnes analyses et conduira donc à de mauvaises interprétations.

Ces prélèvements sont essentiels lorsque l'**examen macroscopique *post-mortem*** ou le tableau épidémioclinique nous font suspecter une infection.

II.2.1.1 Les prélèvements bactériologiques :

Ils font partis des grands prélèvements importants à effectuer à chaque autopsie en faune sauvage si nous voulons être le plus complet possible. En effet, les maladies bactériennes peuvent être **mortelles mais leur étude peut aussi être intéressante** lorsqu'il s'agit d'évaluer leur prévalence dans les populations sauvages.

II.2.1.1.1 Quand prélever et jusqu'à quand ?

Les prélèvements bactériologiques sont possibles même plusieurs jours après la mort. Cependant, certaines populations bactériennes sont plus résistantes (par exemple, les *Arcanobacterium* ou les *Corynebactérium*) **alors que d'autres disparaissent rapidement** en conditions dégradées comme les pasteurelles. Toutefois, si le cadavre est en état de dégradation avancée, **notamment s'il est au cinquième stade de décomposition**, décrit dans la partie III.2.1, **l'intérêt d'un prélèvement reste très limité**. En effet, dans ce cas, nous cultiverons uniquement des bactéries qui ont proliféré après la mort et le prélèvement ne reflètera pas la population bactérienne au moment de la mort de l'animal.

II.2.1.1.2 Condition de conservation du cadavre et prélèvements bactériologique :

Comme expliqué dans la partie précédente, les prélèvements bactériologiques sont possibles sur plusieurs types de cadavres frais. Il est également possible de les effectuer sur des cadavres préalablement congelés ou réfrigérés.

Certaines études récentes (Gauthier, 2019 : Communication personnelle) tendent même à montrer que sur des cadavres ayant subi des altérations, déshydratations... les cultures bactériennes sur prélèvement direct, aboutissent quelque fois à des résultats paradoxaux. **Ce n'est plus le cas lorsque les cadavres sont soumis à une étape de conservation préalable** (réfrigération ou congélation). **Néanmoins, la méthode d'isolement direct sans congélation ou réfrigération est encore considérée comme la plus pertinente**. Elle nécessite, cependant, la **réalisation d'une revivification sur la prise d'essai avant analyse** (cf partie II.2.1.1.6).

En ce qui concerne la congélation, elle permet de sélectionner certains germes. Ainsi, les **entérobactéries et les bactéries issues de l'environnement voient leurs croissances arrêtées** avec la congélation, ce qui représente un gain considérable en termes de diagnostic. Par ailleurs, les populations de certaines bactéries augmentent après décongélation (par exemple *Trueperella pyogenes*) **alors que d'autres ne supportent pas bien cette étape** comme les pasteurelles et les streptocoques. En dépit de ces quelques pertes, la balance bénéfices-risques de la congélation est plutôt positive. En effet, **comme nous l'avons évoqué plus haut**, elle empêche la prolifération des germes environnementaux.

Avant d'effectuer une autopsie et donc des prélèvements sur un cadavre congelé, nous conseillons une décongélation douce de celui-ci. Celle-ci peut être effectuée pendant un à deux jours en chambre froide ou en réfrigérateur à +4°C. Cela permet de limiter les artéfacts **dus à l'opération de congélation-décongélation**, et donc **d'être plus précis sur le diagnostic et sur l'utilité de certains prélèvements**.

II.2.1.1.3 Réalisation d'un prélèvement bactériologique en conditions idéales :

C'est un des premiers prélèvements à réaliser car les risques de contamination par l'environnement et par les autres organes sont importants. Ainsi, le prélèvement bactériologique doit être effectué dans les conditions les plus stériles possibles. Pour cela, il est nécessaire de travailler avec des instruments stériles (exemple : lame de bistouri stérile pour chaque prélèvement). Entre chaque échantillonnage microbiologique, il est important de stériliser le matériel de prélèvement. Différentes techniques de stérilisation du matériel sont décrites dans la littérature, les plus conseillées sont les suivantes :

- La stérilisation par chaleur humide : cette technique utilise un autoclave, un appareil à pression de vapeur d'eau. Elle est très efficace mais ne permet pas de stériliser le matériel sur le terrain.
- La stérilisation par trempage dans une solution alcaline (pH=8) de glutaraldéhyde 2% pendant 20 minutes. Cette technique, utilisable sur le terrain, permet d'éliminer efficacement la majorité des agents infectieux excepté les bactéries sporulées. Pour ces dernières, un temps de trempage d'une heure serait plus adéquat (Ministère chargé de la Santé, 1998).
- La stérilisation par trempage dans une solution d'acide peracétique pendant cinq minutes. Cette solution est plus efficace que le glutaraldéhyde 2% car elle est active beaucoup plus rapidement, même sur les bactérie sporulées (Systchenko, 2003). Toutefois, elle est plus chère et tout aussi dangereuse à la manipulation (Benjdia, 2009).
- Le flambage : cette technique est rarement employée mais reste décrite (Vogelnest et al., 2008). Il faut passer les instruments métalliques à la flamme d'un bec bunsen (Marouf, Tremblin, 2013) jusqu'à rougissement du métal.

Attention, avant d'être stérilisé, tout matériel devra être nettoyé et désinfecté, car ne peut être bien stérilisé que ce qui est propre.

Afin de réaliser le meilleur prélèvement possible, nous conseillons de prélever des organes entiers, ce qui permet d'avoir un maximum d'informations lors de l'exploitation en laboratoire. Si cela n'est pas possible, il est fortement recommandé (Gauthier, 2019 : Communication personnelle), de garder au moins un quart de l'organe pour les analyses bactériologiques (si possible, ce quart d'organe devrait faire 5 cm³ ou plus). Dans tous les cas, chaque organe doit être prélevé en début d'autopsie. Nous conseillons l'utilisation de film alimentaire pour entourer les prélèvements. Il est impératif de séparer les différents organes ainsi prélevés afin d'éviter toute contamination. Pour se faire, nous préconisons de disposer les divers

prélèvements dans des sacs isothermes stériles convenablement identifiés, ou à minima dans des gants de fouilles à usage unique, identifiés également.

II.2.1.1.4 Réalisation d'un prélèvement bactériologique en conditions « dégradées » :

Evidemment, prélever un organe et le réserver pour une unique analyse paraît utopique ou du moins, reste une situation très rare (par exemple, si nous avons une suspicion très forte de maladie bactérienne). Ainsi, pour pallier ce problème, nous allons présenter d'autres méthodes de prélèvements moins idéales mais qui donnent de bons résultats en pratique.

Comme évoqué, dans la partie II.2.1.1.3, nous pouvons prélever seulement une partie de l'organe qui nous intéresse afin de pouvoir effectuer d'autres analyses, notamment les examens histologiques et toxicologiques qui nécessitent un matériel organique important. Aussi, un quart de l'organe voulu peut être gardé pour la bactériologie, la moitié pour l'histologie et le quart restant peut être congelé pour la toxicologie notamment (Vogelnest et al., 2008). Toutefois, il arrive que les prélèvements histologiques et toxicologiques nécessitent un volume organique plus important. Dans ce cas, le prélèvement bactériologique peut aussi être effectué à l'aide d'un écouvillon.

L'utilisation d'un écouvillon doit, elle aussi, être la plus stérile possible. L'écouvillonnage de l'organe en vue d'une analyse bactériologique doit donc être la première des démarches à effectuer lors de la découpe d'un organe avec du matériel stérile. Vogelnest *et al.* conseillent de passer l'extrémité plate d'une lame de scalpel, préalablement stérilisée à la chaleur, sur la surface de l'organe, afin d'éviter toute contamination de l'extérieur de l'organe ; puis de l'inciser avec une nouvelle lame stérile. L'écouvillon doit être sec et le prélèvement effectué au cœur de l'organe ou dans la partie lésée du tissu, tout en restant à proximité de la partie saine (région dite « périphérique intérieure »). En effet, c'est souvent là que se trouve les bactéries (Vogelnest et al., 2008). Il convient de rouler l'écouvillon au niveau des zones précédemment décrites. Nous ne conseillons pas l'utilisation de milieu de culture ou de conservation particulier pour la conservation des écouvillons avant analyse. Toutefois, l'humidification post prélèvement de l'écouvillon, avec de l'eau pour préparation stérile, est une technique décrite et utilisée qui permet de favoriser la survie des bactéries, souvent sensibles à la dessiccation.

II.2.1.1.5 Que prélever pour des analyses bactériologiques ?

Abordons tout d'abord les prélèvements d'intérêt bactériologique à réaliser même en l'absence de lésions. Dans cette catégorie, nous citerons trois organes filtres qui sont le cœur, la rate et le foie. Ces trois organes sont intéressants car ils sont souvent contaminés dans les cas de septicémie. Au contraire, les poumons ou les reins n'ont pas d'intérêt s'ils ne présentent pas de lésions (Gauthier, 2019 : Communication personnelle). Il en va de même du contenu digestif. Il existe néanmoins quelques exceptions, mais cela dépend plus des affections (par exemple : nous conseillons un prélèvement systématique du lobe pulmonaire apical droit lors de suspicion de bronchopneumonie (Gauthier, 2019 : Communication personnelle).

Par ailleurs, il est important de prélever tout organe présentant une ou des lésions susceptibles d'avoir été causées par des bactéries. C'est dans ces tissus que les analyses *post-mortem* donnent le plus de résultats.

Si les prélèvements sont effectués sur des individus de petite taille comme des chiroptères ou des passereaux, il peut être intéressant de réaliser un « pool ». C'est-à-dire de regrouper les mêmes organes de plusieurs individus ensemble. Cela permet d'avoir un volume suffisant pour obtenir des résultats lors des cultures bactériennes.

II.2.1.1.6 Comment conserver un prélèvement bactériologique :

Une fois le prélèvement effectué, la deuxième étape essentielle est la revivification. Cette étape n'a d'intérêt que si l'analyse et l'ensemencement bactérien sont effectués en suivant. La revivification consiste à placer l'échantillon dans une solution de *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pendant 45 minutes à 1 heure, avant de procéder à l'ensemencement. Cette étape est nécessaire pour les bactéries ayant subi un stress, ce qui est souvent le cas ici au vu des conditions de conservation des cadavres. Elle permet à ces micro-organismes de restaurer leurs activités métaboliques et facilite par la suite leurs cultures et leurs détections.

Ainsi, pour un prélèvement bactériologique, nous conseillons donc une analyse immédiate, ou le plus rapidement possible. Si le prélèvement doit être envoyé dans un autre laboratoire, plusieurs méthodes sont possibles afin d'éviter toute dégradation du prélèvement lors du transport :

- Congeler le prélèvement à -20°C empêche la prolifération bactérienne et empêche la contamination par *Escherichia coli* et *Pseudomonas* spp.
- Si le transport peut s'effectuer en un ou deux jours, le prélèvement peut également être réfrigéré à l'aide de pains de glace autour de +4°C (cf partie III.4.3), (Friend, United States Geological Survey, 1999).

- Les écouvillons sont moins sensibles à la prolifération bactérienne mais nous conseillons néanmoins aussi un envoi avec des pains de glace ou un équivalent.

II.2.1.2 Les prélèvements mycologiques :

Les prélèvements mycologiques sont moins fréquents que les prélèvements bactériologiques et virologiques. Toutefois, ils présentent beaucoup de points communs avec ces premiers. **En effet, le diagnostic d'une infection mycologique se fait généralement via une culture fongique.** Cependant, une confirmation par examen cytologique et/ou histologique est souvent nécessaire. Il conviendra de se rapporter aux parties II.2.3 et II.2.2.4 pour les prélèvements fongiques relevant de ces analyses. Attention néanmoins, il est fortement **déconseillé d'utiliser le même prélèvement pour des analyses bactériologiques et mycologiques.** Nous préférons l'utilisation de deux échantillons distincts.

Comme pour les prélèvements bactériologiques, les prélèvements fongiques peuvent être effectués sur cadavre congelé ou idéalement, frais. La congélation permet de stopper la prolifération bactérienne qui via les toxines produites peut entraîner la destruction des souches fongiques et ainsi des erreurs d'interprétation et des cultures stériles.

II.2.1.2.1 Les prélèvements pour les cultures fongiques en conditions idéales :

Dans l'idéal, de la même manière qu'en bactériologie, nous préconisons de prélever un organe entier ou au moins une moitié d'organe. En effet, les cultures fongiques sont plus demandeuses en matériel organique car les prélèvements nécessitent souvent des traitements avant mise en culture (McGowan, 2015). Comme décrit dans la partie II.2.1.1.4, l'application de l'extrémité plate d'une lame chaude de scalpel sur la surface de l'organe avant découpe est conseillée également pour les prélèvements fongiques.

Lors de suspicion d'une mycose cutanée ou des phanères, nous pouvons être amené à prélever ces derniers (majoritairement des poils). Pour se faire, nous conseillons d'arracher les poils en périphérie des lésions observées après avoir nettoyé ces dernières avec de l'alcool à 70°. Cela permet d'éliminer les bactéries qui seraient également présentes sur les poils. Attention à ne pas couper les poils mais à bien les arracher (Hungerford et al., 1998) à l'aide d'un clamp ou d'un porte-aiguille stérile. En effet, il est très important d'avoir la base du poil pour les examens en laboratoire. Il est inutile de prélever des poils souillés par du pus ou un exsudat car les analyses postérieures sont mauvaises (Samanta, 2015). Nous préconisons d'arracher environ 15 poils intacts et stériles.

Par ailleurs, lors des mycoses cutanées, il peut être intéressant de prélever des écailles ou la couche superficielle de l'épiderme. Pour se faire, après désinfection de la peau à l'alcool

à 70°, il est conseillé d'utiliser un scalpel à lame émoussée ou une brosse à dent (Samanta, 2015), les deux instruments doivent être stérilisés avant utilisation (cf partie II.2.1.1.2).

II.2.1.2.2 Les prélèvements pour les cultures fongiques en condition dégradées :

Contrairement au prélèvement bactériologique, l'utilisation d'écouvillon comme support pour les cultures fongiques est déconseillée (McGowan, 2015) car beaucoup moins sensible et spécifique. Nous préconisons donc le prélèvement de morceaux d'organe comme décrit dans la partie II.2.1.1.3. Toutefois, s'il n'est pas possible de prélever un fragment d'organe, l'écouvillonnage reste une solution intéressante. La technique d'écouvillonnage est la même que celle décrite dans la partie II.2.1.1.4.

En outre, il existe un autre prélèvement qui consiste à prendre une partie des granulomes ou autres lésions que nous suspectons d'origine fongique, afin de les regarder au microscope après coloration. Ce premier examen peut nous orienter vers une atteinte fongique et ainsi nous décider à réaliser des prélèvements pour une confirmation par cytologie ou histologie.

II.2.1.2.3 Que prélever pour les analyses fongiques ?

Un prélèvement systématique d'organe en routine n'est pas forcément conseillé. Toutefois, certains organes sont plus susceptibles de présenter un intérêt pour des examens mycologiques. Ainsi, Hungerford *et al*/ citent les poumons et les nœuds lymphatiques sans donner plus de précision (Hungerford et al., 1998).

Dans tous les cas, nous conseillons de prélever chaque organe qui présente une lésion potentiellement fongique ainsi que tout granulome ou lésion purulente compatible avec une localisation fongique.

Par ailleurs, s'il y a suspicion de mycoses cutanées, nous conseillons de prélever les poils ou autres phanères (cf partie II.2.1.2.1).

Enfin, si nous pensons à une infection due à des mycotoxines, nous préconisons de prélever le contenu du tube digestif, notamment de l'estomac, ainsi que les potentiels restes alimentaires qui pourraient se trouver à côté du corps.

II.2.1.2.4 Conservation des prélèvements mycologiques :

Les prélèvements d'organes pour analyses mycologiques doivent impérativement être séparés afin d'éviter toute contamination. Ils doivent être placés dans des récipients stériles comme des sacs isothermes, sans chasser l'air de ces derniers (McGowan, 2015).

Les organes doivent être délivrés dans les deux jours après le prélèvement et réfrigérés à l'aide de pains de glace ou équivalent lors du transport. Si cela est impossible, nous préconisons la congélation.

Les poils et autres phanères peuvent être mis dans une enveloppe scellée et conservés à température ambiante pendant plusieurs semaines sans aucune dégradation.

II.2.1.3 Les prélèvements virologiques :

Les analyses virologiques sont souvent sous exploitées en faune sauvage car la plupart des acteurs ne savent pas quels tissus prélever, les cultures cellulaires sont difficiles et souvent peu concluantes, surtout lorsque nous travaillons en conditions dégradées. Toutefois, il existe désormais des techniques de laboratoire qui permettent une meilleure exploitation des prélèvements en ciblant notamment la détection des acides nucléiques qui sont plus stables que les particules virales en tant que telles et sont donc exploitables beaucoup plus longtemps.

En général, il est d'abord conseiller de rechercher des acides nucléiques des virus ciblées avant de tenter des isolements viraux. Les acides nucléiques se conservent bien à -20° au sein du cadavre pendant une à deux semaines, donc travailler sur des cadavres congelés ne posent pas de problème sur du court terme. En revanche, l'acide ribonucléique (ARN) se dégrade vite et une congélation à -80°C est fortement conseillée pour conserver ces acides nucléiques. En ce qui concerne les virus à acide désoxyribonucléique (ADN), celui-ci se conserve plus longtemps à -20°C mais la congélation à -80°C est toutefois conseillée. Par ailleurs, si nous nous intéressons aux cultures cellulaires et donc à la charge virale, il est important d'éviter les variations de température avant prélèvement. Ainsi, les différents auteurs (Gould, 1999) conseillent de congeler le corps à -80°C pour une préservation optimale. Stocker à -20°C limite néanmoins la dégradation virale dans un premier temps. Si cela n'est pas possible, la plupart des virus à ADN non enveloppés sont stables à +4°C donc au réfrigérateur pendant plusieurs jours.

II.2.1.3.1 Les prélèvements virologiques en conditions idéales :

Pour des prélèvements destinés à de la PCR ou de la culture cellulaire, dans l'idéal, nous conseillons l'échantillonnage de morceaux d'organes en condition stérile. Ainsi que nous l'avons décrit dans les parties précédentes, nous conseillons de « stériliser » la surface de l'organe avec une lame chauffée, la découpe se fait à l'aide de lame de bistouri stérile puis le

morceau d'organe placé dans un contenant stérile. Le morceau d'organe ainsi isolé doit avoir un volume supérieur à 1 cm³ si possible (Markey, 2013).

II.2.1.3.2 Les prélèvements virologiques en conditions dégradées :

Si le prélèvement d'une partie d'un organe est impossible (par exemple si d'autres examens sont nécessaires en priorité avant l'analyse virologique) ou si les conditions de stockage avant analyse ne permettent pas de conserver les prélèvements décrits dans la partie précédente, il existe d'autres solutions. En effet, depuis quelques années, des nouveaux supports de prélèvements existent. Il s'agit de papier buvard faisant office de système de stockage des acides nucléiques. Le plus connu de ces papiers est la carte FTA® développée par la société General Electric Healthcare.



Figure 1 : différents exemples de carte FTA® (GE Healthcare Life Sciences, 2011) :

La carte FTA® est très intéressante car elle permet le stockage sur une longue durée à température ambiante (de +20 à +25°C d'après la notice) des acides nucléiques. La congélation n'est donc plus nécessaire. De plus, ces papiers servent de support à différents types de prélèvements : les fluides mais aussi les tissus ou les écouvillons. Enfin, les cartes FTA® permettent l'extraction d'acides nucléiques même en conditions dégradées (tissus autolysés) dans plus de la moitié des cas (Dove et al., 2011 ; GE Healthcare Life Sciences, 2011).

Avant utilisation, il est conseillé de stocker les cartes FTA® dans des sachets en plastiques scellés à température ambiante. Il est également nécessaire d'identifier chaque carte avec un crayon à papier et non un stylo car les contaminations sont possibles avec ce dernier. Dans

le même but, il est nécessaire de manipuler ces cartes ainsi que les organes avec des gants stériles. Pour un tissu, il faut le couper au niveau de la partie qui nous intéresse (typiquement la lésion si on veut identifier un virus) avec des instruments stériles, puis, appliquer avec vigueur le morceau ainsi découpé sur la carte FTA® . **Nous préconisons l'utilisation de papier FTA avec indicateur coloré qui change de couleur, en passant du rose au blanc une fois le temps de contact suffisant. Ensuite, il faut laisser sécher la carte à l'air libre pendant au moins trente minutes, idéalement pendant trois heures. Attention, lors de la phase de séchage il est important d'éviter d'exposer la carte au soleil ou à une atmosphère trop humide. Sinon, nous conseillons de passer la carte au four à micro-ondes pendant vingt secondes à neuf cents watts (Aviagen, 2015).**

L'utilisation d'écouvillon pour l'identification virale est moins intéressante qu'un morceau d'organe. Elle est donc moins conseillée. Cependant, cette pratique peut s'avérer intéressante car elle est facilement réalisable et bien connue, notamment dans le domaine aviaire. La réalisation d'un écouvillon trachéal est par exemple possible après le retrait du bloc trachée - poumon lors de l'autopsie.

II.2.1.3.3 Que prélever pour les analyses virologiques ?

Au contraire de la bactériologie, il n'y a pas de prélèvement de routine en virologie. Le type de prélèvement dépend souvent de l'infection suspectée et est donc très variable. Notons toutefois que certains prélèvements reviennent souvent dans les recommandations : les poumons, le foie, la rate ainsi que les amygdales et leurs nœuds lymphatiques associés. Ainsi, à l'aide de carte FTA® , il serait intéressant de réaliser des empreintes de ces organes afin d'avoir une bibliothèque d'acides nucléiques disponible si nécessaire.

Par ailleurs, il est important de rappeler que les meilleurs prélèvements en virologie sont ceux qui contiennent une lésion. En effet, c'est dans ces dernières que nous trouvons les plus fortes charges virales et donc également une grande concentration d'acides nucléiques.

II.2.1.3.4 Conservation des prélèvements virologiques :

La conservation des prélèvements d'organes est importante puisque les virus se dégradent vite. S'ils sont envoyés dans les deux jours, l'ajout d'un ou plusieurs pains de glace dans le colis triple emballage est nécessaire et suffisant. Ils seront ensuite conservés au réfrigérateur à +4°C avant analyse. Il faut faire attention au maintien de la chaîne du froid car de nombreux virus sont sensibles à la chaleur et donc aux changements de température.

Si le prélèvement ne peut pas être traité dans les 48 heures, nous conseillons de congeler le prélèvement. La congélation à -80°C est idéale car la plupart des virus ne se dégradent pas en dessous de -60°C (Gould, 1999). Toutefois, la conservation à -20°C est largement

suffisante pour conserver les virus à ADN. Si la congélation n'est pas possible, l'utilisation de cinq à dix volumes de solution tamponnée de glycérine 50% est décrite (Terio et al., 2018) pour **préserver le prélèvement jusqu'à congélation ou analyse**. Les prélèvements peuvent également être conservés dans des milieux de cultures spéciaux afin de maximiser leur conservation, même si le paramètre le plus important reste la température. Parmi ces milieux de culture, les plus utilisés dans la conservation virale à court terme sont le *brain heart infusion broth* (BHIB), le *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), le *Virocult...* (Spackman et al., 2013).

Pour la conservation des cartes FTA® , il suffit de les mettre dans un sachet plastique fermé **et vidé de son air**. L'ajout d'un ou plusieurs sachets de gels de silices permet de conserver **une atmosphère sèche et ainsi se prémunir de l'apparition de moisissures ou autres contaminations**. Le sachet peut être stocké à température ambiante entre +15°C et +25°C pendant plusieurs années.

Les écouvillons trachéaux et cloacaux sont la plupart du temps mis dans des milieux de **cultures spécialisés et congelés jusqu'à analyse**.

II.2.1.4 Les prélèvements en parasitologie :

Les parasites sont des animaux qui vivent sur ou dans une autre espèce animale qui est appelée « espèce hôte ». Ces parasites se nourrissent sur ou dans leurs hôtes, auprès duquel ils passent une grande partie de leur vie (Greiner, Mader, 2006). Toutes les espèces de vertébrés sont parasités. Des parasites sont donc présents sur la majeure partie des cadavres des animaux de la faune sauvage autopsiés.

II.2.1.4.1 Intérêt des prélèvements parasitologiques post-mortem en faune sauvage :

La collecte et l'examen des parasites présents sur un cadavre est intéressante car cela permet de déduire des infos sur la santé et l'historique de l'animal (Dierauf, Gulland, 2001). En particulier, le dénombrement des parasites ainsi que la diversité d'espèces donnent des indices sur le statut physiologique de l'individu examiné. Les parasites peuvent avoir plusieurs effets délétères sur leurs hôtes (Foreyt, 2001) :

- Démangeaison : certains parasites comme les poux entraînent des démangeaisons importantes pouvant **aller jusqu'à l'automutilation**.
- Transmission de maladie(s). Les tiques notamment sont connues pour être des vecteurs de maladies.
- Anémie : certains parasites sont hématophages et lymphophages et entraînent de sévères anémies.

- Obstruction mécanique de l'**appareil digestif** par certains parasites digestifs.
- Dommages tissulaires : certains parasites provoquent des lésions importantes voire irréversibles dans les organes où ils sont logés.
- Perte de poids : **de nombreux parasites sont à l'origine d'une baisse de l'absorption des nutriments et donc une baisse du poids et un affaiblissement de l'animal.**

Toutefois, en faune sauvage, la situation est différente de celle des **animaux d'élevages** ou domestiques. Ainsi, la plupart des animaux de la faune sauvage amenés vivants en centre de soin ont beaucoup de parasites. Il convient alors de différencier deux grands types **d'individus**. Les animaux qui sont faibles car parasités et ceux qui sont affaiblis par une maladie intercurrente et en conséquence sont fortement parasités. **Souvent, c'est cette** deuxième situation qui prédomine (Woodford et al., 2000).

Enfin, le prélèvement *post-mortem* comprend quelques spécificités. Les parasites externes **restent peu de temps sur un cadavre et le quittent dès qu'il refroidit**. Les prélèvements doivent donc être effectués rapidement après la mort pour pouvoir voir ces parasites. Ces conseils doivent être adaptés selon le type de parasites recherchés :

- Un cadavre frais est toujours idéal pour pouvoir rechercher un ensemble exhaustif de parasites.
- Un cadavre congelé permettra de conserver les parasites adultes dans leur matrice. Ainsi, des études récentes ont mis en évidence des parasites vivants (encore mobiles) dans des poumons congelés. Toutefois, la congélation est très délétère pour les parasites sanguins et les coccidies, et elle supprime les caractères de flottaison des **œufs de nématodes rendant certains tests d'identification impossibles à réaliser**.
- Les fèces sont utilisables si elles sont prélevées dans les 24 heures. Il peut arriver de **travailler avec des excréments émis il y a 48 heures mais ce n'est pas idéal** comme nous le verrons dans la partie II.2.1.4.2.2.
- **La recherche de parasites sanguins doit s'effectuer** sur cadavre frais ou réfrigéré avec une date de mort ne dépassant pas idéalement les 72 heures.

Il est donc important de choisir un mode de conservation adapté, tenant compte des signes cliniques et des lésions. Dans la plus grande majorité des cas rencontrés en faune sauvage, **le cadavre a plus de 24 heures**. S'il ne peut être autopsié rapidement, la congélation est **fortement recommandée afin de conserver un maximum d'informations au niveau parasitaire**.

II.2.1.4.2 Quels prélèvements post-mortem réaliser en parasitologie sur la faune sauvage et comment les conserver ?

II.2.1.4.2.1 Le prélèvement des parasites externes :

Comme expliqué précédemment les parasites externes quittent vite un cadavre dès lors qu'il refroidit (Woodford et al., 2000). Pour pouvoir les récolter il est donc nécessaire d'effectuer un prélèvement peu de temps après la mort de l'animal. Les parasites peuvent également se trouver dans l'environnement proche du corps et il est intéressant de les prélever.

En ce qui concerne les contaminations *post-mortem* en parasitologie, elles sont très peu nombreuses. Les plus connues sont les myiases cutanées ou sous-cutanées. Lorsque nous observons ces dernières sur un cadavre, il y a deux explications différentes, à corréliser avec l'état du cadavre :

- Lorsque le cadavre est en état de décomposition avancée, les myiases sont souvent dues à une ponte *post-mortem* car un cadavre en décomposition est un bon milieu de développement pour ces parasites.
- Lorsque le cadavre est en bon état avec une décomposition débutante, la ponte pourrait être *ante-mortem*. Ce cas peut se présenter sur un animal faible et se déplaçant lentement, pouvant exposer une ou des zones humides de son corps et donc favorables au développement des myiases. Parmi ces zones, on retrouve souvent les lésions cutanées plus ou moins profondes ainsi que les muqueuses des animaux en mauvais état général, comme les marges anales ou cloacales d'individus diarrhéiques (Mullineaux, 2016).

Les prélèvements doivent être réalisés avec des gants et en évitant toute morsure par un parasite car ces derniers sont vecteurs de nombreuses zoonoses. Ainsi, les membres de l'équipe responsables du prélèvement devront effectuer un contrôle visuel de leur corps afin d'objectiver l'absence de parasites, principalement de tiques, en fin d'autopsie.

Les parasites peuvent être récoltés à l'aide d'une pince, d'un tire-tique ou à la main. La plupart du temps, il faut chercher les parasites dans le plumage, le pelage ou les écailles de l'animal. Pour cela, il peut être nécessaire de raser ou de plumer l'individu. Chez les reptiles, il faut soulever les écailles au niveau de zones surélevées ou lésées, pour apercevoir certains ectoparasites. Pour certains parasites microscopiques cutanés, comme les agents de gale, un raclage cutané (cf partie II.2.3.2.2) est préconisé (Gaur et al., 2017).

La conservation des parasites dépend de leur utilisation. Ainsi, il est nécessaire de conserver certains parasites vivants pour l'identification de maladie potentiellement transmises par ce vecteur, en particulier pour les parasites hématophages. C'est le cas des tiques, connues

pour la transmission de nombreux agents pathogènes comme la méningoencéphalite à tique ou la tularémie (Gavier-Widén et al., 2012). Les parasites sont donc placés vivants dans des bocaux en verre ou en plastique. Certains auteurs conseillent même de disposer un petit morceau de papier buvard, imbibé de quelques gouttes d'eau, dans ce même bocal afin de préserver les parasites (Woodford et al., 2000). Pour éviter de détériorer les tiques lors de l'échantillonnage, nous conseillons de les prélever à l'aide d'un tire-tique en les prenant au niveau de la tête. Pour le transport, les tiques gorgées de sang voyagent mieux que celles dont le dernier repas est plus éloigné dans le temps (Woodford et al., 2000).

Lorsqu'il n'est pas obligatoire de conserver l'animal vivant, le meilleur moyen de conserver les ectoparasites est d'utiliser une solution d'éthanol à 70°¹ qui permet une conservation sur le long terme, à température ambiante (Foreyt, 2001 ; Gaur et al., 2017). Une solution de formol à 4% peut également être employée à ces mêmes fins (Foreyt, 2001 ; Terio et al., 2018).

Pour tous les parasites, qu'ils soient vivants ou morts, une fois prélevés, nous conseillons de noter leurs nombres ainsi que leurs lieux de prélèvements. Le dénombrement ne doit pas être précis à l'unité près mais plutôt à la dizaine ou à la centaine si l'individu est très fortement parasité. Par ailleurs, il serait malvenu de mélanger, dans un seul pot, des parasites provenant de cadavres d'individus différents (Woodford et al., 2000).

II.2.1.4.2.2 Les prélèvements de fèces :

Les examens complémentaires utilisés en parasitologie nécessitent des fèces fraîches. En effet, plus la date d'émission des matières fécales augmente et plus il y a de chance que les œufs éclosent et deviennent des larves (Foreyt, 2001). Par ailleurs, plus les excréments sont exposés à l'environnement et plus les risques de contamination externe augmentent, notamment à cause de certains nématodes vivant dans le sol ou d'autres parasites. Dans l'idéal, les fèces ne devraient pas être prélevées au-delà de 24 heures après la mort de l'animal. Cependant, leur exploitation peut rester intéressante jusqu'à 72 heures *post-mortem*. Dans ce cas, nous conseillons de réaliser le prélèvement au niveau de la partie postérieure du tube digestif ou dans le rectum car c'est là que la contamination externe aura le moins d'impact et ce sont les excréments les plus « frais » que nous pouvons trouver.

¹ Attention, il ne faut pas utiliser une solution d'alcool médical, employée pour la désinfection de la peau, car elle contient du camphre qui ne permet pas une bonne conservation des parasites.

Dans l'idéal, il faut récupérer une quantité de matière fécale permettant la réalisation de plusieurs analyses de laboratoire. Ainsi, nous conseillons, lorsque cela est possible, de prélever au moins 10 g de fèces. Elles peuvent être disposées dans des sacs plastiques, des gants de fouilles, des sacs poubelles ou des pots à prélèvement tant que ces contenant sont fermés. L'aspect des fèces au moment du prélèvement doit être noté car il peut orienter nos hypothèses diagnostiques et donc nos examens complémentaires (Cooper, 2009).

Une fois prélevées, les fèces doivent être analysées le plus rapidement possible. En attendant ces analyses, elles peuvent être stockées à +4°C car cette température permet une bonne conservation des œufs et des larves d'endoparasites. Dans certaines études, l'analyse de fèces de cerf, réfrigérées pendant 90 jours, donne des résultats très corrects (Foreyt, 1986). En revanche, la congélation dégrade fortement la valeur parasitologique des prélèvements tout comme la conservation dans l'éthanol à 70°. En effet, la congélation détruit les coccidies et fait perdre leur caractère de flottaison aux œufs de nématodes. Si la conservation à +4°C est impossible, les selles peuvent être immergées dans une solution de formol à 10%. Après 200 jours dans ce milieu de stockage, la détection de 50% des œufs de certains parasites est encore possible (Foreyt, 1986). Le formol peut donc être employé comme solution de préservation des matières fécales en conditions dégradées.

II.2.1.4.2.3 Le prélèvement des parasites internes :

Les endoparasites sont ceux que nous recherchons principalement en autopsie de faune sauvage car nous travaillons souvent sur des cadavres non frais ou congelés. Or comme nous l'avons évoqué dans les parties précédentes, cette technique de conservation nous laisse l'opportunité de visualiser et de prélever des parasites adultes dans leur matrice, c'est-à-dire les organes de l'animal.

Ainsi, lors de la coupe des différents organes, des parasites peuvent être visualisés et prélevés. Les organes les plus fréquemment parasités sont les poumons, le foie, le cœur, le cerveau et tous les segments du tube digestif. Cette liste n'est pas exhaustive et il conviendra d'adapter notre technique de recherche aux parasites dont nous suspectons la présence. L'idéal est de prélever les parasites dans leur totalité pour faciliter leur identification. Par exemple, le scolex des ténias est très important pour les différencier (Gaur et al., 2017).

Pour le tube digestif, une fois celui-ci individualisé du reste du corps, nous conseillons de le sectionner par segments anatomiques. Cette étape effectuée, il faut ouvrir toute la section sur sa longueur et racler délicatement son contenu avec un doigt ganté. Ce contenu doit être placé dans un récipient externe. Une fois tout le contenu enlevé, il faut examiner la muqueuse et enlever les parasites encore accrochés. Pour être plus précis, le contenu du récipient peut

ensuite être rincé et tamisé avec un tamis de 150 µm ou de 300 µm pour récupérer les autres parasites (Greiner, Mader, 2006). Une fois les parasites prélevés, il est conseillé de les conserver dans des pots séparés selon les portions du tube digestif.

Les différents parasites **peuvent tous être conservés dans l'éthanol à 70°, après avoir été** rincés avec une solution saline (Woodford et al., 2000 ; Terio et al., 2018). Comme pour les ectoparasites, le formol à 10% permet également une conservation à long terme (Foreyt, 2001). Ceci est particulièrement vrai pour les trématodes, les cestodes et les acanthocéphales.

Il existe des techniques particulières pour conserver au mieux les différents endoparasites (Woodford et al., 2000):

- Les trématodes : il faut les rincer avec une solution saline puis les plonger dans une solution froide de formol à 4% ou 10%. Ceci fait, il faut agiter vigoureusement cette solution, à couvercle fermé dans un pot à prélèvement adapté. En effet, cet acte permet de fatiguer musculairement le vers **et donc d'éviter une contraction excessive** lors de la mort.
- Les cestodes : dans la mesure du possible, il faut tremper plusieurs fois le vers dans une solution de formol à 4% ou 10%. Pour se faire, il faut le tenir par son extrémité la plus distale car le poids du vers lui permet de rester bien étiré et donc de conserver son architecture lors de la fixation. Attention, cependant, ce processus doit être réalisé dans un environnement contrôlé, sous hotte par exemple, à cause de la toxicité du formol (cf. partie II.2.2.3.1).
- Les nématodes : **il faut les mettre dans une solution chaude d'éthanol à 70°**. Cela entraîne la mort instantanée du parasite et conserve donc son architecture. Une fois cette étape effectuée, le vers **peut être transféré dans une solution d'éthanol à 70°** à laquelle nous pouvons rajouter de la glycérine à 2% pour prévenir toute dessiccation.
- Les acanthocéphales : la fixation doit être effectuée lorsque leur proboscis est éversé. **Si ce n'est pas le cas, le vers peut être placé entre deux lames de verres jusqu'à** éversion du proboscis puis fixé.

II.2.1.4.2.4 La réalisation d'un frottis sanguin :

La technique la plus simple pour visualiser, et donc prélever, une partie des parasites sanguins, consiste en la réalisation **d'un frottis sanguin**. Pour cela, il est nécessaire d'utiliser du sang prélevé sur un animal fraîchement décédé afin de conserver des cellules sanguines intactes et interprétables (cf partie II.2.6 pour les techniques de prélèvement sanguin en *post-mortem*). En effet, de nombreuses études en médecine humaine démontrent une dégradation

des cellules sanguines en *post-mortem*. Ainsi, les hématies resteraient intactes jusqu'à 19 heures après la mort (Shah et al., 2015), mais leur architecture commencerai être modifiées au-delà et serait non identifiables après 72 heures *post-mortem* (Dokgöz et al., 2001). Le frottis peut être effectué avec du sang fraîchement prélevé et placé dans un tube avec un anticoagulant (**préférentiellement** l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) chez les oiseaux et les reptiles) ou sur du sang prélevé dans les mêmes conditions mais conservé à +4°C pendant quelques heures (Foreyt, 2001).

La réalisation du frottis sanguin se fait par étape (Munson, 2013) :

Il faut déposer une goutte de sang sur le tier distal d'une lame de verre. Ensuite, il faut glisser une seconde lame vers la goutte afin qu'une petite quantité de sang soit aspirée par capillarité (cf image B de la figure 2). Attention, l'angle de contact entre les deux lames est important, il conditionne la longueur du frottis : plus l'angle est aigu et plus le frottis est long. Puis, il faut pousser la seconde lame d'un mouvement régulier en conservant le même angle (cf image C de la figure 2). Il n'est pas nécessaire d'exercer une pression importante pour avoir un bon résultat, il faut seulement maintenir un contact continu entre les deux lames.

Un frottis réussi a une forme similaire à « une langue de chat » comme sur l'image D de la figure 2. Si ce n'est pas le cas, nous conseillons de changer l'angle de la seconde lame (il doit être plus obtus si le frottis est trop long) ou de laisser plus ou moins de sang monter par capillarité au moment de l'étape B de la figure 2.

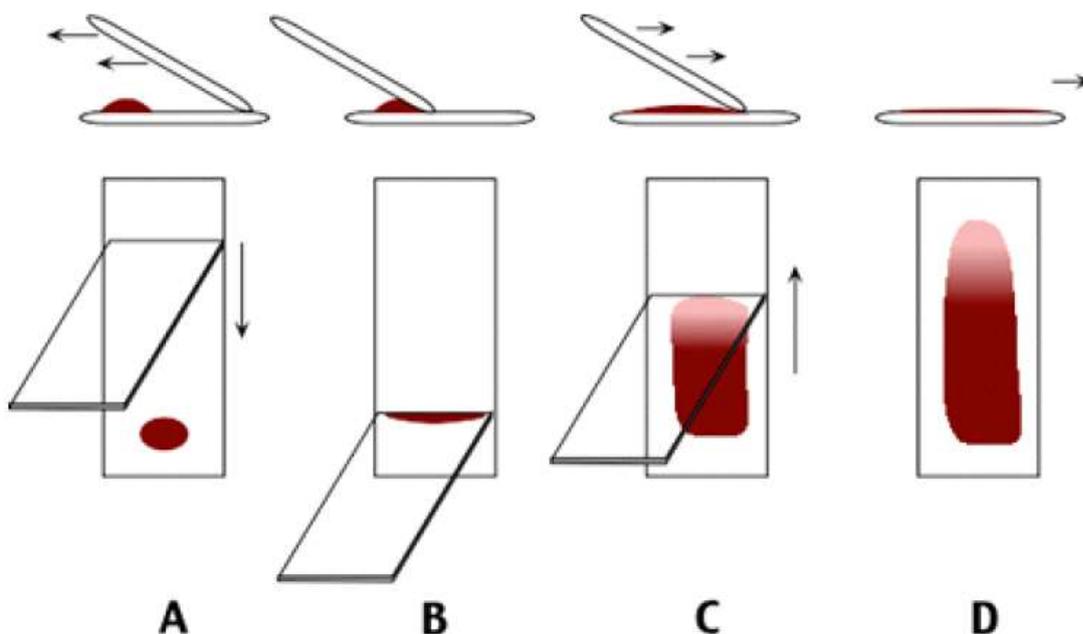


Figure 2 : Etapes de la réalisation d'un frottis sanguin (Munson, 2013) :

II.2.2. Les prélèvements histologiques :

II.2.2.1 Intérêts des prélèvements histologiques :

Dans les pays anglo-saxons, l'autopsie est divisée en deux parties, un examen macroscopique et systématiquement un examen microscopique. Lorsque que nous parlons d'examen microscopique, nous parlons d'histologie. Cet examen doit donc être employé le plus souvent possible lors de l'autopsie d'un animal sauvage.

En effet, l'histologie présente de nombreux avantages :

- Elle fait partie intégrante du diagnostic et peut mettre en évidence des éléments pathognomoniques ou fortement indicateurs.
- Elle permet de confirmer ou d'infirmer le résultat d'autres examens complémentaires.
- Elle oriente vers certains examens complémentaires puisqu'elle met en évidence des éléments qui ne sont potentiellement visibles qu'à l'échelle cellulaire.

Par ailleurs, comme nous allons le voir par la suite, les prélèvements histologiques sont faciles à réaliser et se conservent très longtemps dans le formol puisque c'est un fixateur à vie. Nous pouvons donc fixer n'importe quel organe suspect au moment de l'autopsie, puis y revenir au besoin. Par exemple, si les autres examens complémentaires pratiqués se sont révélés non concluants. La question devrait donc ne plus être : « Quand faire un prélèvement histologique ? » mais plutôt : « Quand ne faut-il pas réaliser un prélèvement histologique ? » (Lemberger, 2019 : Communication personnelle).

Les rares situations pour lesquelles l'histologie n'a pas d'intérêt sont les suivantes (Lemberger, 2019 : Communication personnelle) :

- Le cadavre est dans un état de décomposition très avancée, il appartient à la catégorie 5 dans la classification présentée dans la partie III.2.1.
- La cause de la mort est parfaitement claire et identifiée.
- Lorsque les lésions cliniques nous orientent de manière pathognomonique vers un autre examen complémentaire de certitude (Par exemple : la PCR pour un lagomorphe présentant des lésions caractéristiques de myxomatose comme un œdème de la face et des parties génitales, un écoulement oculaire purulent... (Gavier-Widén et al., 2012)).

II.2.2.2 Comment réaliser un bon prélèvement histologique ?

Réaliser un bon prélèvement paraît assez simple, mais, en pratique, il y a de nombreuses erreurs pouvant compromettre l'obtention de résultats interprétables.

Pour commencer, plus le prélèvement est réalisé rapidement sur un cadavre frais, plus l'examen histologique sera de qualité, car cela permet de s'affranchir des lésions d'autolyse. En outre, un prélèvement histologique doit toujours être effectué sur un cadavre frais ou réfrigéré. En effet, la congélation produit des artefacts que nous abordons dans la partie II.2.2.6. Ces derniers rendent l'examen histologique, ainsi que son interprétation, très difficile.

L'échantillon doit être prélevé à l'interface entre le tissu sain et la lésion, s'il y en a une, visible macroscopiquement. En effet, si le prélèvement est effectué au centre de la lésion, il y a une perte d'informations non négligeable. L'échantillon doit également être représentatif de l'organe au niveau fonctionnel. Par exemple une coupe de rein de mammifère passera forcément par la corticale et la médullaire pour conserver toutes les informations physiologiques de l'organe. Par ailleurs, l'épaisseur de l'échantillon ne doit pas excéder un centimètre. Ce paramètre est très important car le formol, dans lequel le prélèvement sera placé par la suite, ne pénètre pas au-delà de 0,5 centimètre dans les tissus (Terio et al., 2018 ; McDonough, Southard, 2017). Or un prélèvement mal fixé, est un prélèvement qui sera difficilement interprétable par la suite puisque l'architecture tout comme les zones d'intérêt risquent de ne pas être conservées.

Le prélèvement histologique est à réaliser de la manière la plus propre possible. Si une même lame de bistouri sert sur plusieurs zones, elle doit, à minima, être essuyée avec du papier absorbant entre chaque prise d'essai. Le prélèvement pour l'histologie est un des derniers à être effectué sur les organes car les autres examens complémentaires, notamment les examens microbiologiques, nécessitent des conditions stériles plus drastiques et donc plus facilement obtenues en début d'autopsie (Terio et al., 2018).

II.2.2.3 Conservation des prélèvements histologiques :

II.2.2.3.1 Le formol :

Une fois le prélèvement réalisé, il faut le fixer. Pour cela un seul produit fiable existe, le formaldéhyde. Nous utilisons des solutions tamponnées de formaldéhyde à 4% ou à 10% appelées formol. Les solutions à 10% sont préconisées par les anglo-saxons mais les résultats produits sont les mêmes avec celles diluées à 4% (Lemberger, 2019 : Communication personnelle). De surcroît, elles ont l'avantage d'être plus faciles à diluer (dilution au dixième avec de l'eau à partir d'une solution mère saturée à 37-40%) et surtout elles sont moins toxiques.

En effet, le formol est un composé chimique toxique et surtout **oncogène**. L'exposition répétée à une dose de formol importante augmente significativement le risque de **développement de cancer du nasopharynx**, comme l'a montré une étude de l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (AFSSET, 2009). Par ailleurs, le formol peut être responsable d'irritations de la peau et des muqueuses, voir provoquer des dermatites d'hypersensibilité ainsi que des chocs anaphylactiques (McDonough, Southard, 2017). Il convient donc d'être très précautionneux lorsque nous utilisons du formol pour fixer nos échantillons. Dans l'idéal, le pot de prélèvement doit être ouvert dans un espace aéré ou sous une hotte d'aspiration. Le temps d'ouverture doit être minimal, et il ne faut pas respirer au-dessus du flacon.

Malgré les risques inhérents à la manipulation du formol, celui-ci **reste très utilisé car il n'existe pas d'alternative** aussi efficace. Des études ont été réalisées, notamment avec des produits à base de glyoxal, mais les résultats ne sont pas satisfaisants (Marcon et al., 2008). Les intérêts de la fixation sont les suivants (McDonough, Southard, 2017) :

- **Prévenir l'autolyse** grâce à une double action. Le formol inactive les enzymes lysosomales mais altère également leurs cibles, ce qui limite grandement leurs actions.
- Prévenir la putréfaction car les bactéries ne se développent pas dans le formol.
- Obtenir une résistance à la déformation des tissus : normalement en *post-mortem*, les **organes s'affaissent et se déforment ce qui n'est pas le cas dans le formol**.

Attention, le formol possède également des défauts. Lors de la fixation, de nombreux ponts **protéiques se mettent en place**. Ces derniers entraînent la **fragmentation de l'ADN et de l'ARN** en petits morceaux lors de leur extraction. Les analyses PCR et *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) sont donc plus compliquées (mais réalisables) sur un tissu préalablement formolé. Par ailleurs, comme dit plus haut, les bactéries ne se développant pas dans le formol, les cultures bactériennes ne sont alors pas réalisables avec ces organes.

Il existe **d'autres précautions à prendre avec le formol**. Tout d'abord, il doit absolument avoir été préparé dans les trois mois qui précède son utilisation car au-delà de cette période, ses propriétés fixantes disparaissent (Lemberger, 2019 : Communication personnelle). Ensuite, il faut faire attention avec les solutions de formol à 10% lors de prélèvement à des températures négatives car ces solutions gèlent. Il faut donc les protéger avec une matière isolante ou au moins du papier journal.

II.2.2.3.2 Comment conserver et envoyer un prélèvement fixé ?

Une fois prélevé un échantillon doit être fixé selon un protocole bien précis :

- Il doit être placé pendant les premières 48 heures dans un pot contenant 10 fois le **volume de l'organe en formol**.
- Puis après ces 48 premières heures, le volume de formol peut être diminué car la fixation est la plus importantes dans les heures suivant la mise en formol.
- **Le pot contenant l'échantillon ainsi que le formol en quantité limité peut être conservé à température ambiante, il peut également être placé à +4°C mais ce n'est pas nécessaire dans l'absolu** (Terio et al., 2018). En revanche, il est interdit de le mettre au congélateur sinon le prélèvement sera ininterprétable.

Il existe quelques exceptions concernant la fixation qui sont pour la plupart développée dans la partie II.2.2.4. Néanmoins, sur le terrain, il est possible de placer les échantillons dans un volume de formol moins conséquent pendant un court laps de temps. Une fois de retour au laboratoire, il faut reprendre le protocole classique de fixation.

Lorsque nous avons prélevé plusieurs échantillons, il est tout à fait possible de les mettre dans le même pot de formol. Il y a trois conditions pour cela :

- Adapter le volume de formol **au nombre de prélèvements afin de s'assurer de conserver un volume d'un pour dix**. Placés dans un pot sans quantité suffisante de formol, les échantillons seront mal fixés et donc potentiellement inexploitable en **raison des artefacts d'autolyse** (cf partie II.2.2.6.1).
- Etablir la liste des organes fixés dans chaque pot et la placer dans le colis contenant les échantillons.
- **Ne pas mélanger plusieurs échantillons provenant d'espèces différentes dans un même pot (voire plusieurs individus d'une même espèce ayant des symptômes différents)**.

Toutefois, lorsqu'il est nécessaire d'identifier une zone en particulier, il est intéressant d'effectuer une fixation dans un pot séparé, ou du moins avec des organes très différents. Par exemple, si nous suspectons un phénomène tumoral au niveau du duodénum, il ne faudrait pas placer cet échantillon dans le même pot qu'un morceau de jéjunum mais plutôt avec du foie (tout en le précisant dans la liste d'organes fournie avec chaque pot).

Pour ce qui concerne les pots à prélèvements, il convient d'éviter le plus possible l'utilisation des pots à couvercles rouge en polyéthylène dur. Ces pots sont très fragiles et se vissent mal, ce qui les rend incompatible avec l'utilisation d'un produit dangereux comme le formol. Il vaut mieux leur préférer des pots beaucoup plus résistants, généralement fournis par les

laboratoires d'anatomopathologie. Il existe même une solution idéale qui permet d'éviter l'exposition au formol grâce à des pots spéciaux comme ceux équipés du dispositif Biopsafe®. Dans ces derniers, le formaldéhyde est comprimé dans le couvercle hermétique pour éviter toute exposition par le toucher ou l'inhalation. Après avoir vissé le flacon, le formol est libéré en toute sécurité par une simple pression du pouce sur le couvercle, il n'est donc jamais en contact aérique avec le manipulateur. Les deux parties sont indépendantes et sont visibles sur la figure 3.



Figure 3 : Dispositif Biopsafe® (Jacobsen, 2019) :

Enfin, pour envoyer un prélèvement histologique, il est très important de respecter la règle du triple emballage. Celle-ci est détaillée dans la partie III.4.4, **elle est d'autant plus importante**, ici, que nous travaillons avec un produit dangereux comme le formol. Il est donc nécessaire **d'éviter toute fuite ou toute exposition** à ce fixateur.

II.2.2.4 Quels prélèvements réaliser en histologie ?

Dans cette partie, nous **distinguerons les prélèvements essentiels** que sont le cœur, les reins, le foie, les poumons, la rate, certains nœuds lymphatiques et le cerveau, des autres prélèvements, qui sont plus situationnels. Nous expliquerons également l'intérêt de l'analyse histologique de ces organes, tout en détaillant les particularités de prélèvement si elles ont lieu d'être.

II.2.2.4.1 Les organes essentiels à prélever en histologie :

II.2.2.4.1.1 Le foie :

Le foie fait partie des organes filtres de l'organisme. Ainsi tout problème systémique sera répercuté sur le foie. Par exemple, en cas d'hépatite de Rubarth sur un animal de la famille des canidés ou des mustélidés, nous pourrions observer des inclusions virales intra nucléiques dans les cellules de Kupffer et les hépatocytes (Gavier-Widén et al., 2012).

Une particularité concerne le prélèvement de la vésicule biliaire. Celle-ci doit être vidée de toute bile avant la mise en formol car une fixation de ce liquide biologique est impossible et il continuerait à être actif.

II.2.2.4.1.2 Les reins :

Comme le foie, les reins sont des organes filtres de l'organisme. Ils sont également le lieu de la formation de l'urine par filtration du sang. Par ailleurs, de nombreuses affections urinaires ou inflammatoires sont visibles microscopiquement au niveau des reins. Par exemple, des dépôts d'amyloïdes sont visibles dans les glomérules rénaux en cas d'amyloïdose (Gavier-Widén et al., 2012).

Lors du prélèvement, il est important de conserver l'architecture du rein à la coupe. Pour les mammifères, il faut donc que l'échantillon comporte, si possible, une partie de la médulla et une partie de la corticale. Sinon, deux prélèvements devront être soumis.

II.2.2.4.1.3 La rate :

La rate est également un organe filtre, puisque c'est un des lieux de production et de stockage des cellules sanguines. Des problèmes d'ordres systémiques pourront donc être répercutés sur cet organe.

II.2.2.4.1.4 Le cœur :

Haut lieu de la circulation sanguine, le cœur appartient lui aussi aux organes filtres. C'est également un tissu où peuvent se loger certains parasites comme *Toxoplasma gondii*.

Le cœur peut être prélevé en entier, si l'épaisseur du myocarde le permet (diffusion du formol sur moins de 0,5 centimètres). Dans ce cas, nous conseillons d'ouvrir le cœur afin d'avoir une bonne diffusion du fixateur. Pour se faire, il faut d'abord couper l'apex du cœur, puis inciser le cœur droit le long de la paroi interventriculaire. Une fois arrivé au sillon coronaire, il faut incliner les ciseaux pour ouvrir l'oreillette droite, c'est la technique dite de « l'ouverture en Z ».

Pour le cœur gauche, il faut inciser le long de la paroi interventriculaire de l'apex du ventricule gauche jusqu'à l'aorte.

Si le cœur est trop volumineux, il est possible d'effectuer une section transverse du cœur et de la fixer. Celle-ci doit obligatoirement passer par les deux ventricules et la paroi interventriculaire.

II.2.2.4.1.5 Les poumons :

Ce sont des organes importants car ils filtrent l'air et excrètent des gaz. Ce sont également des lieux sensibles aux infections par les parasites et par les champignons comme *Aspergillus* sp. ou *Candida* sp.

II.2.2.4.1.6 Le cerveau :

C'est le seul organe que nous conseillons de ne pas sectionner. Si section il doit y avoir, celle-ci doit être effectuée au milieu des deux hémisphères cérébraux, de façon à en garder au moins un entier pour l'histologie. Toutefois, il faut essayer le plus possible d'avoir les deux hémisphères cérébraux. En effet, une fois fixé et envoyé en laboratoire, la découpe est effectuée par un spécialiste. Ce dernier effectue des tranches de quelques millimètres d'épaisseur. Certaines tranches sont sélectionnées aléatoirement et montées sur lames. Les autres sont remises dans le bon ordre dans le formol, maintenues grâce à une serviette, de façon à pouvoir y revenir plus tard si nécessaire (Oehmichen et al., 2009). L'intérêt de conserver un encéphale entier réside dans la possibilité d'observer des lésions unilatérales.

Par ailleurs, au moment du prélèvement, il est important de fixer l'encéphale mais également une partie de la moelle allongée. En effet, c'est dans cette dernière que se trouve des éléments importants pour le diagnostic différentiel des affections neurologiques chez les grands carnivores et quelques ruminants. C'est notamment un prélèvement très utile pour investiguer les causes d'amyotrophies marquées chez les loups.

La fixation du cerveau est très particulière. Le volume nécessaire à cette dernière est souvent plus important que pour les autres organes puisque celui est gardé entier. Contrairement à d'autres tissus de l'organisme, le formol a la capacité de pénétrer le tissu nerveux en profondeur, ce qui permet de soumettre l'encéphale dans son ensemble. Néanmoins, cela augmente le temps de fixation. (Dawe et al., 2009 ; McFadden et al., 2019). La première étape de fixation dure donc deux à trois jours pour les petits encéphales d'une épaisseur inférieure à un centimètre. En revanche, elle est plutôt de cinq à sept jours pour les plus gros. Il faut bien faire attention à garder l'organe droit et à plat dans le pot de formol. Sinon, il y a un risque d'obtenir des déformations artéfactuelles et irréversibles.

II.2.2.4.1.7 Les nœuds lymphatiques :

De manière générale, les nœuds lymphatiques sont très intéressants à prélever. En effet, ils participent au drainage et à l'épuration de la lymphe ; en ce sens, ce sont donc des organes filtres. Par ailleurs, ils ont un rôle essentiel dans l'immunité puisqu' ils sont le lieu de recrutement des cellules de l'immunité spécifique et non spécifique. Les nœuds lymphatiques ont donc un rôle de sentinelles qu'il convient d'étudier à l'échelle microscopique.

Nous conseillons donc de prélever de manière systématique :

- Le nœud lymphatique mésentérique qui permet de révéler des phénomènes systémiques et digestifs. Par exemple, dans le cas de tularémie chez un lagomorphe, des inclusions intracellulaires de *Francisella tularensis* sont visibles dans certains macrophages des nœuds lymphatiques. Il y a également une inflammation granulomateuse associée à des zones de nécroses au niveau des nœuds lymphatiques (Gavier-Widén et al., 2012).
- Tout nœud lymphatique dès lors que l'organe auquel il est associé présente une lésion. Ainsi, nous préconisons le prélèvement des nœuds lymphatiques trachéobronchiques en cas d'atteinte pulmonaire.
- Tout nœud lymphatique présentant une lésion ou un changement de consistance, couleur, taille...

Certains nœuds lymphatiques ayant une structure cortico-médullaire, le prélèvement devra conserver cette architecture. En outre, si une lésion est présente, l'échantillonnage sera également effectué à l'interface entre le tissu sain et le tissu lésé.

II.2.2.4.2 Les prélèvements situationnels en histologie :

II.2.2.4.2.1 Les prélèvements histologiques en cas de signes digestifs :

Ces prélèvements sont impossibles à réaliser si le cadavre n'est pas très frais. En effet, les organes digestifs sont ceux qui sont le plus sensible aux phénomènes d'autolyse et de putréfaction. En effet, ces organes possèdent une flore commensale importante qui prolifère après la mort cf partie III.2.1.1).

Les échantillons à prélever sont les suivants :

- Le duodénum, avec le pancréas dont les parties exocrine et endocrine sont intéressantes en histologie pour leurs différentes fonctions.
- Plusieurs segments du jéjunum : une portion initiale, une médiale, et une dans la portion distale.
- Une partie de l'iléon.

- Une partie du cæcum.
- Une partie du colon.
- **Les nœuds lymphatiques associés** aux différents segments.

Lors du prélèvement, il est important de ne pas abimer la muqueuse digestive. Nous **conseillons donc ne pas la toucher avec les instruments d'autopsie.**

De plus, comme nous l'avons évoqué dans la partie II.1, le prélèvement de portions d'organes digestifs constitue un cas particulier. En effet, sans identification, les échantillons se ressemblent beaucoup et pourraient être confondus. Ainsi, il faut les différencier, pour cela, il y a plusieurs méthodes :

- Les mettre dans des pots à prélèvements séparés : dans chaque pot il y aurait donc **un seul morceau de l'intestin, le nœud lymphatique associé (et d'autre tissus non digestifs si nécessaire).**
- **Les identifier à l'aide de fils de sutures** en jouant sur la longueur du chef long ou sur le nombre de points. Toutefois, cette méthode est un peu traumatique pour les tissus et **n'est pas forcément idéale, notamment pour les morceaux d'intestin.**
- Mettre les prélèvements dans des cassettes individuelles identifiées **à l'aide d'un crayon à papier** et plongées, elles aussi, dans le formol. **L'ordre des prélèvements dans la cassette doit être notifiés au moment de l'envoi au laboratoire.**

II.2.2.4.2.2 Les prélèvements histologiques sur des jeunes animaux :

Sur les jeunes animaux, **certains organes sont plus développés que chez l'adulte et sont donc importants à prélever :**

- Le thymus : **c'est le lieu de différenciation des lymphocytes T. Son analyse est utile dans les cas de suspicion d'atteintes systémiques ou des cellules sanguines.**
- La moelle osseuse : nous y revenons dans la partie suivante.
- La bourse de Fabricius (uniquement chez les oiseaux) : **il s'agit du lieu de différenciation des lymphocytes B, c'est un organe essentiel à prélever.** En effet, il peut comporter des **marqueurs d'infections en cas d'atteinte systémique** comme pour la maladie de Gumboro chez les galliformes.

//.2.2.4.2.3 Le prélèvement histologique du tissu osseux :

Les os sont intéressants à prélever dans certaines situations :

- Lorsqu'ils présentent des lésions. Dans ce cas, si l'os est trop gros pour être prélevé entièrement, le prélèvement est effectué à l'interface entre le tissu sain et le tissu lésé.
- Lorsque de nombreux os présentent des anomalies de croissance ou des déformations, une maladie métabolique peut être suspectée. Il est important de prélever les zones de croissances osseuses comme l'épiphyse des os longs. Le prélèvement s'étendra alors jusqu'à la moitié de l'os. Attention chez les oiseaux il vaut mieux par exemple préférer le tibio-tarse aux os pneumatés comme le fémur ou l'humérus.
- Lorsqu'un prélèvement de moelle osseuse est nécessaire comme chez les animaux jeunes ou lors de suspicion d'anémie. C'est au niveau de l'épiphyse que se trouve la moelle osseuse en quantité importante, au contraire de la diaphyse riche en graisse chez l'adulte. L'épiphyse du fémur, autour du col, constitue un prélèvement idéal.

Là encore, il est possible de mettre les prélèvements osseux dans des cassettes afin de leur apporter une protection et de bien différencier les fragments.

//.2.2.4.2.4 Le prélèvement histologique du tissu oculaire :

Les yeux sont très rarement prélevés. Ils le sont uniquement en cas de lésion d'importance majeure. Attention c'est un des tissus qui se dégrade le plus vite, il est déconseillé de le prélever au-delà de 12 heures après la mort (Vogelnest et al., 2008). Certains auteurs conseillent de placer les yeux dans une solution de liquide de Bouin pendant 24 heures. Ce dernier est constitué de formaldéhyde, d'acide picrique et d'acide acétique. C'est un très bon fixateur des tissus mous et délicats. Attention cependant car il colore les tissus en jaune, coloration qui peut être éliminée avec des lavages à l'éthanol (CliniSciences, 2019). Après une journée, le tissu peut être déplacé dans une solution de formol classique.

Pour les grands animaux, l'œil doit être incisé le long de la sclère afin de permettre une bonne pénétration et fixation du formol (Vogelnest et al., 2008). Enfin, il est conseillé d'effectuer un point de suture dans la sclère dorsale pour pouvoir orienter le prélèvement dans l'espace.

II.2.2.4.2.5 *Les prélèvements histologiques sur des petits individus :*

Il est souvent très difficile de réaliser une autopsie de précision sur des petits animaux comme les oiseaux de la famille des passereaux, des petits rongeurs, des petits amphibiens ou des chiroptères. Sur ces individus, il paraît utopique de réaliser des prélèvements précis sur des organes très petits.

Dans ces cas-là, il y a deux solutions :

- Fixer les organes en entier. Vu l'épaisseur des tissus, le rôle du formol sera assuré.
- Fixer l'individu dans son ensemble. Dans ce cas, il sera nécessaire de réaliser une incision au niveau de la partie ventrale de l'animal afin que le formol puisse pénétrer et fixer les différents organes.

II.2.2.5 Devenir des prélèvements histologiques :

Une fois le prélèvement expédié dans un laboratoire d'anatomopathologie les échantillons sont mis en cassettes puis, via un processus assez long (déshydratation, inclusion, coupe et coloration), montés sur lames de verre colorées. Ces dernières sont ensuite analysées par les anatomopathologistes.

Lors de la réalisation des lames, plusieurs colorations peuvent être utilisées selon la suspicion ou les éléments à rechercher. Il est donc très important de fournir une copie du rapport d'autopsie avec le prélèvement. Ainsi, certaines colorations seront plus adaptées pour visualiser les éléments fongiques comme la coloration à l'acide périodique de Schiff (PAS), d'autres pour mettre en évidence une amyloïdose comme la coloration rouge Congo etc...

Par ailleurs, il existe certaines méthodes utiles en immunologie comme l'immunomarquage. Cette dernière permet de mettre en évidence la présence ou non de certains agents pathogènes par la détection de certains antigènes. Par exemple, c'est le gold standard pour la recherche de toxoplasmose. C'est une alternative intéressante lorsqu'aucun échantillon congelé ou frais n'est disponible pour réaliser une PCR et si un processus infectieux est suspecté. Toutefois, si les deux examens complémentaires sont possibles, il vaudra mieux lui préférer la PCR.

II.2.2.6 Les artefacts rencontrés en histologie à la suite de mauvais prélèvements :

II.2.2.6.1 L'autolyse :

Lorsque des échantillons autolysés sont analysés microscopiquement, il peut y avoir des variations de couleur, des changements architecturaux... Ainsi, il n'est pas utile de prélever les organes filtres si ces derniers sont autolysés car les interprétations microscopiques sont très difficiles.

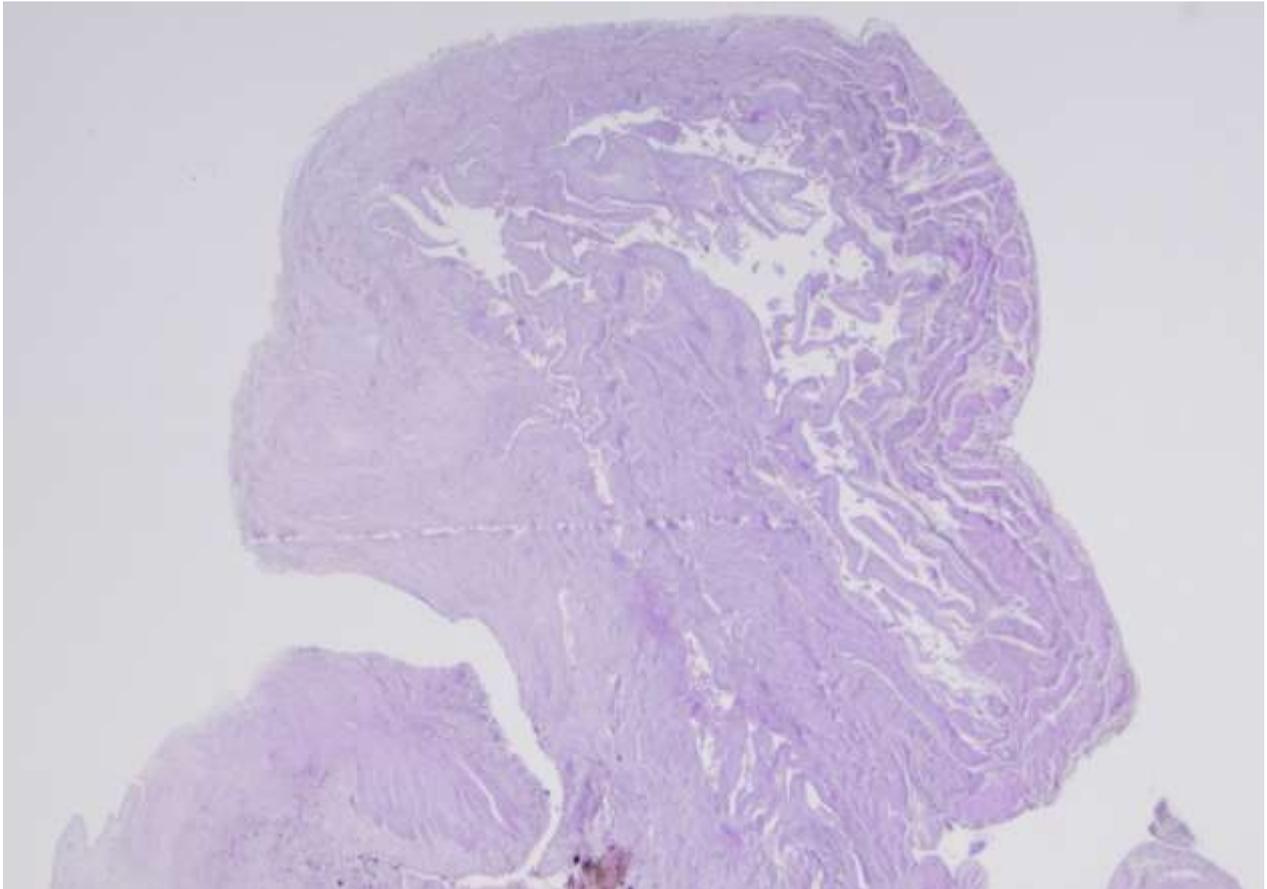


Figure 4 : Image d'autolyse sur une lame histologique d'un intestin de putois (Vet Diagnostics, 2019)

Ici, sur la figure 4, sur une portion du tube digestif d'un putois, nous pouvons voir une perte de la structure en couche de l'intestin ainsi qu'une desquamation.

Sur la figure 5, qui est une coupe de rein de chevreuil, le fait d'avoir un échantillon autolysé pose un problème car on ne sait pas si les lésions visibles sont imputables à une nécrose tubulaire ou à l'autolyse.

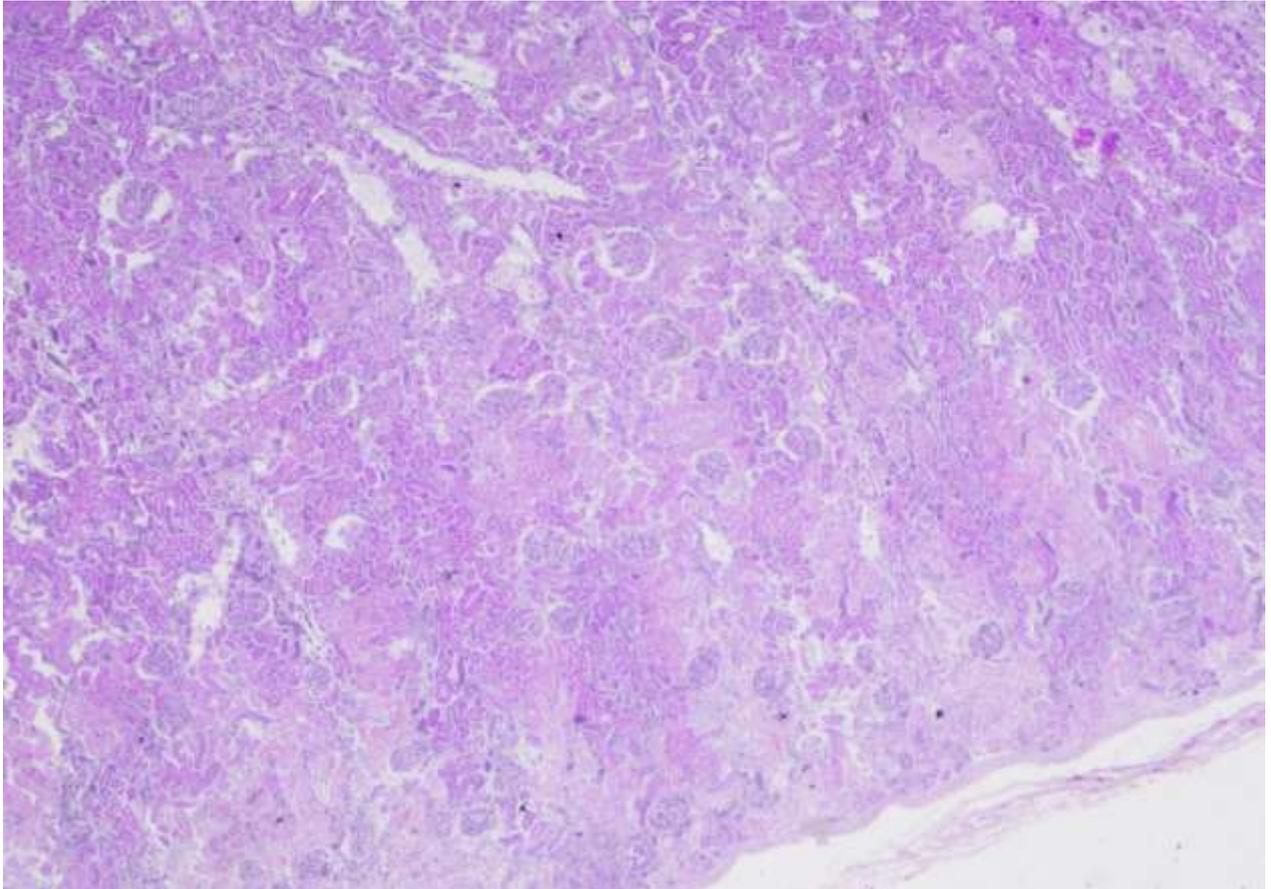


Figure 5 : Image d'autolyse sur une lame histologique d'un rein de chevreuil (Vet Diagnostics, 2019)

II.2.2.6.2 La congélation :

C'est l'un des problèmes les plus fréquents en histologie qui entraîne la formation de cristaux de glace qui vont déformer les organes au niveau microscopique. Les artefacts que l'on rencontre le plus fréquemment sont :

- Des images similaires à celles observées en cas d'œdème, notamment dans le poumon. C'est ce que nous pouvons voir sur les poumons de mouflon de la figure 6 : tout le liquide éosinophile entre les cellules du parenchyme pulmonaire correspond à l'artefact dû à la congélation-décongélation.
- L'existence de ligne qui traverse les organes comme celles visibles sur le foie d'une buse de la figure 7.
- Une perte de l'architecture tissulaire.

Ces artefacts peuvent être, en partie, évités si une décongélation lente du corps est effectuée à température ambiante avant l'autopsie.

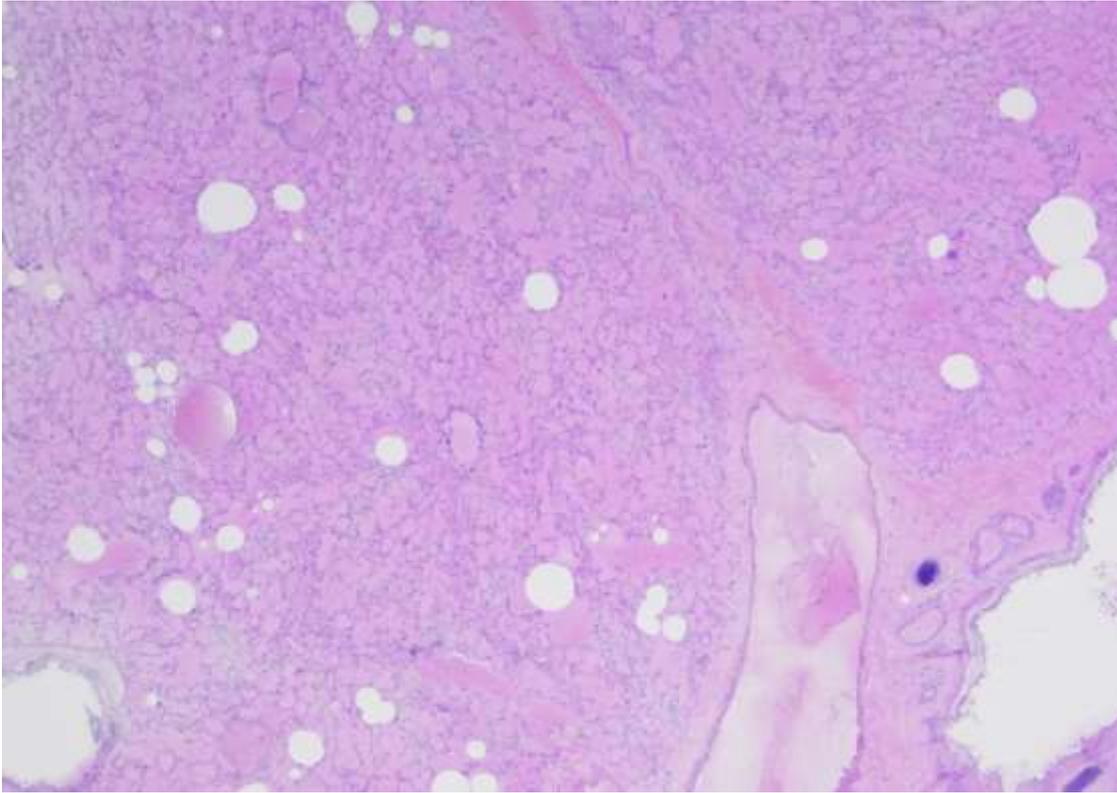


Figure 6 : Artefacts dus à la congélation sur une lame histologique d'un poumon de mouflon (Vet Diagnostics, 2019)

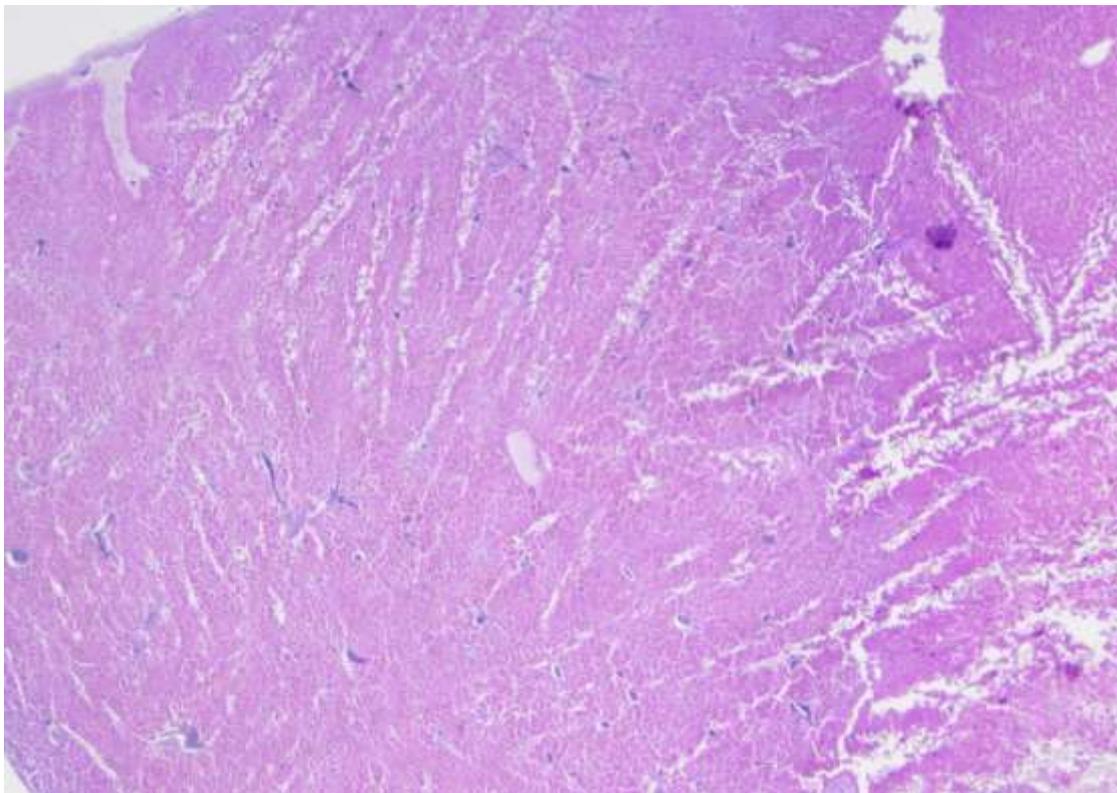


Figure 7 : Artefacts dus à la congélation sur une lame histologique d'un foie de buse (Vet Diagnostics, 2019)

Néanmoins, malgré ces artéfacts, il est possible d'établir certains diagnostics histologiques en observant des lames d'organes prélevés sur des individus congelés. Ainsi, sur la figure 8, qui est une coupe de poumon de chevreuil, nous avons pu diagnostiquer une pneumonie vermineuse.

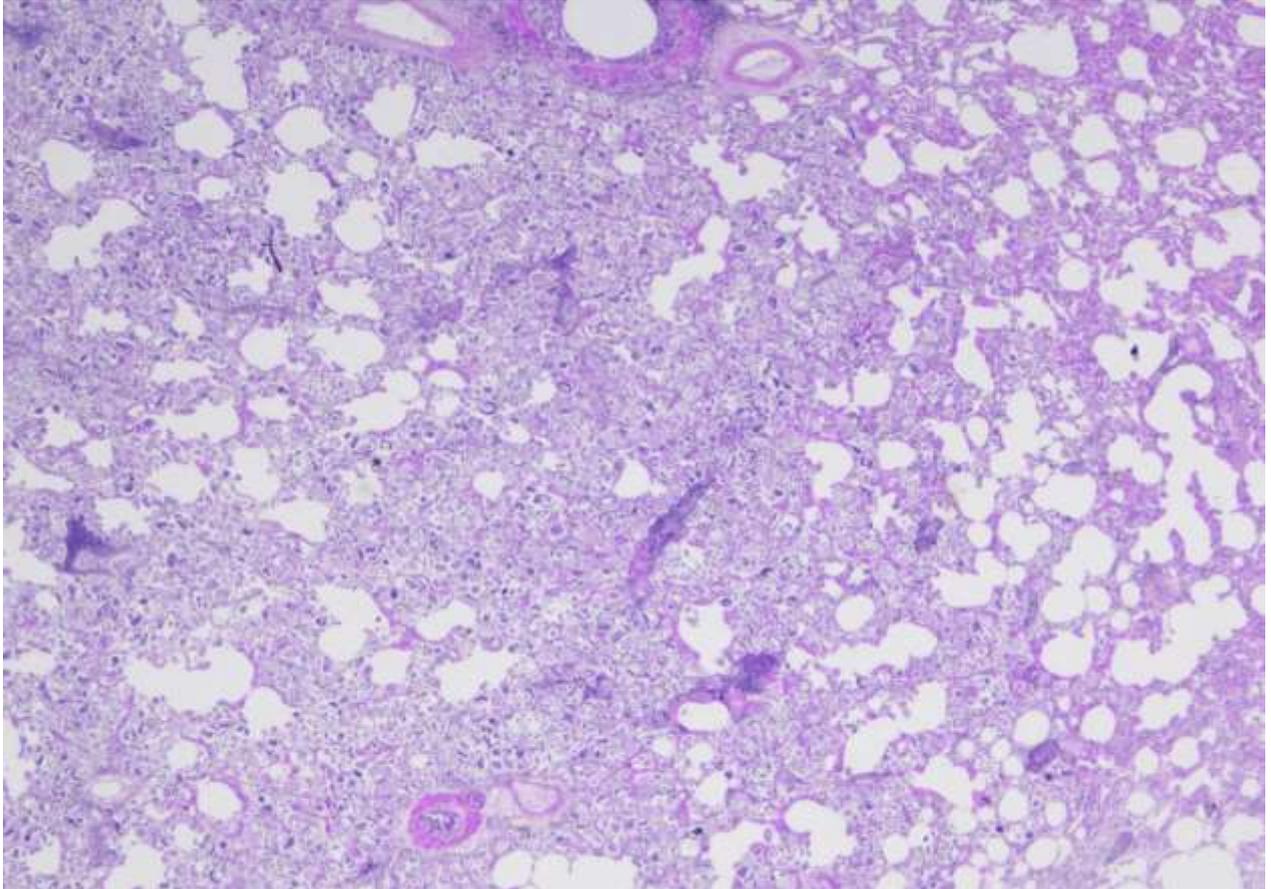


Figure 8 : Diagnostic d'une pneumonie vermineuse sur une lame histologique d'un poumon de chevreuil préalablement congelé (Vet Diagnostics, 2019)

II.2.2.6.3 La mauvaise fixation :

Les deux exemples présentés ici (figures 9 et 10) montrent des tissus qui n'ont pas été bien fixés. Sur la figure 9, qui est issue de la coupe d'une rate de mouflon, la mauvaise fixation entraîne une perte de continuité cellulaire et l'architecture microscopique de l'organe n'est pas conservée.

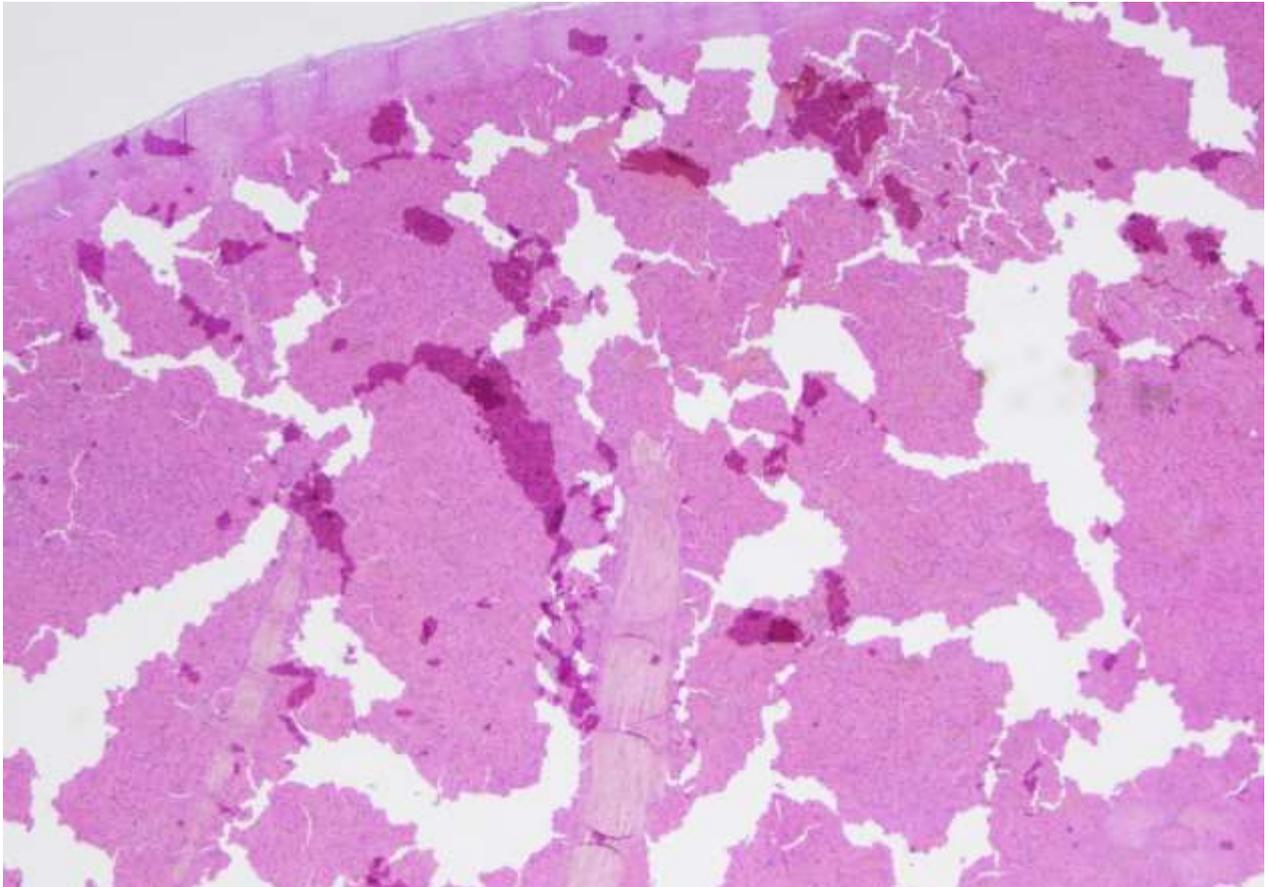


Figure 9 : Mauvaise fixation sur une lame histologique de rate de mouflon (Vet Diagnostics, 2019)

Sur le rein de buse de la figure 10, la partie centrale présente une coloration différente du reste de l'organe ainsi qu'une désorganisation tissulaire caractéristique d'une mauvaise fixation.

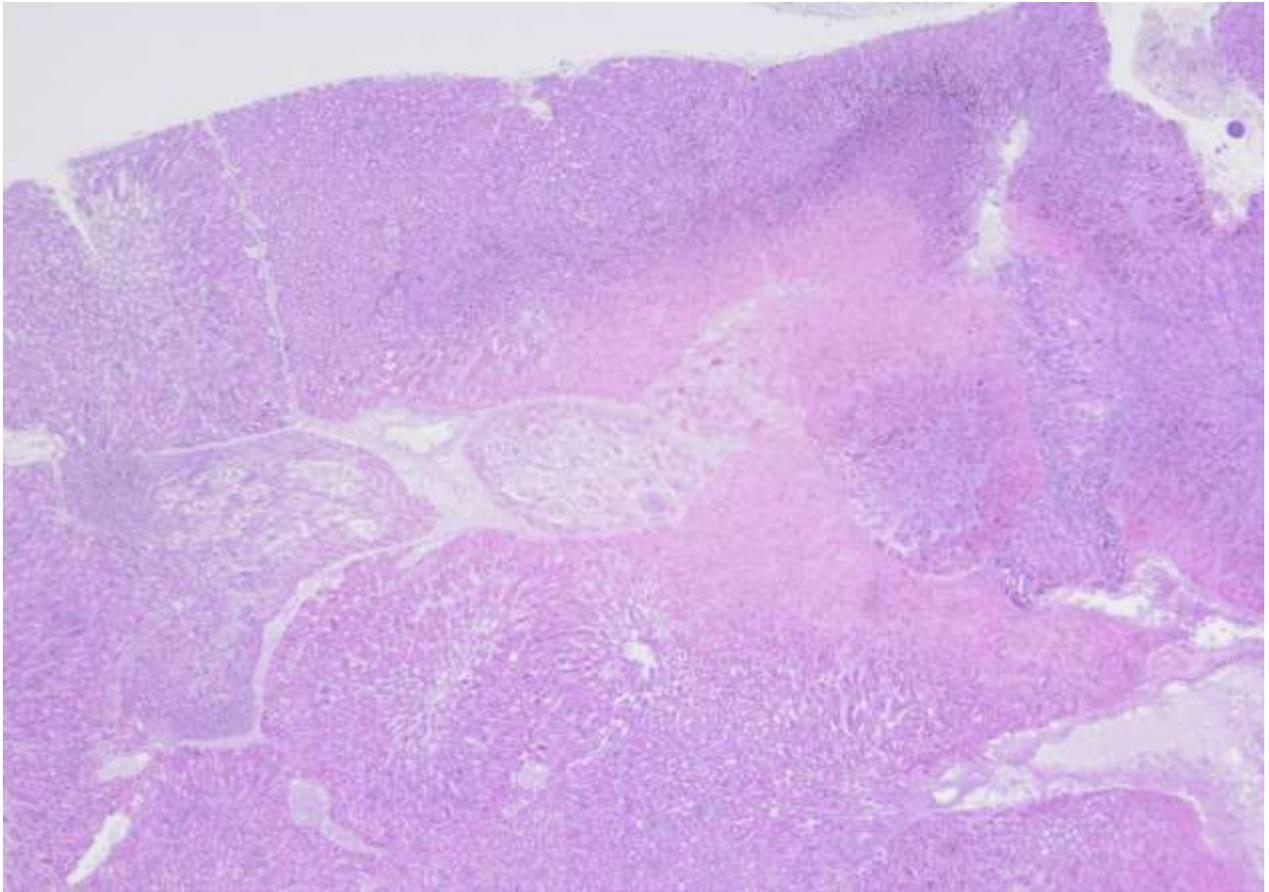


Figure 10 : Mauvaise fixation sur une lame histologique de rein de buse (Vet Diagnostics, 2019)

II.2.2.6.4 Les artefacts de sections :

Lors de la préparation des lames, les techniciens effectuent des sections dans les blocs de paraffine. Quelquefois, des artefacts sont observables et correspondent à ces lignes de section. Cela est visible sur la figure 11, issue d'une coupe de nœud lymphatique chez un chevreuil, où nous pouvons observer des lignes de sections en travers du tissu.

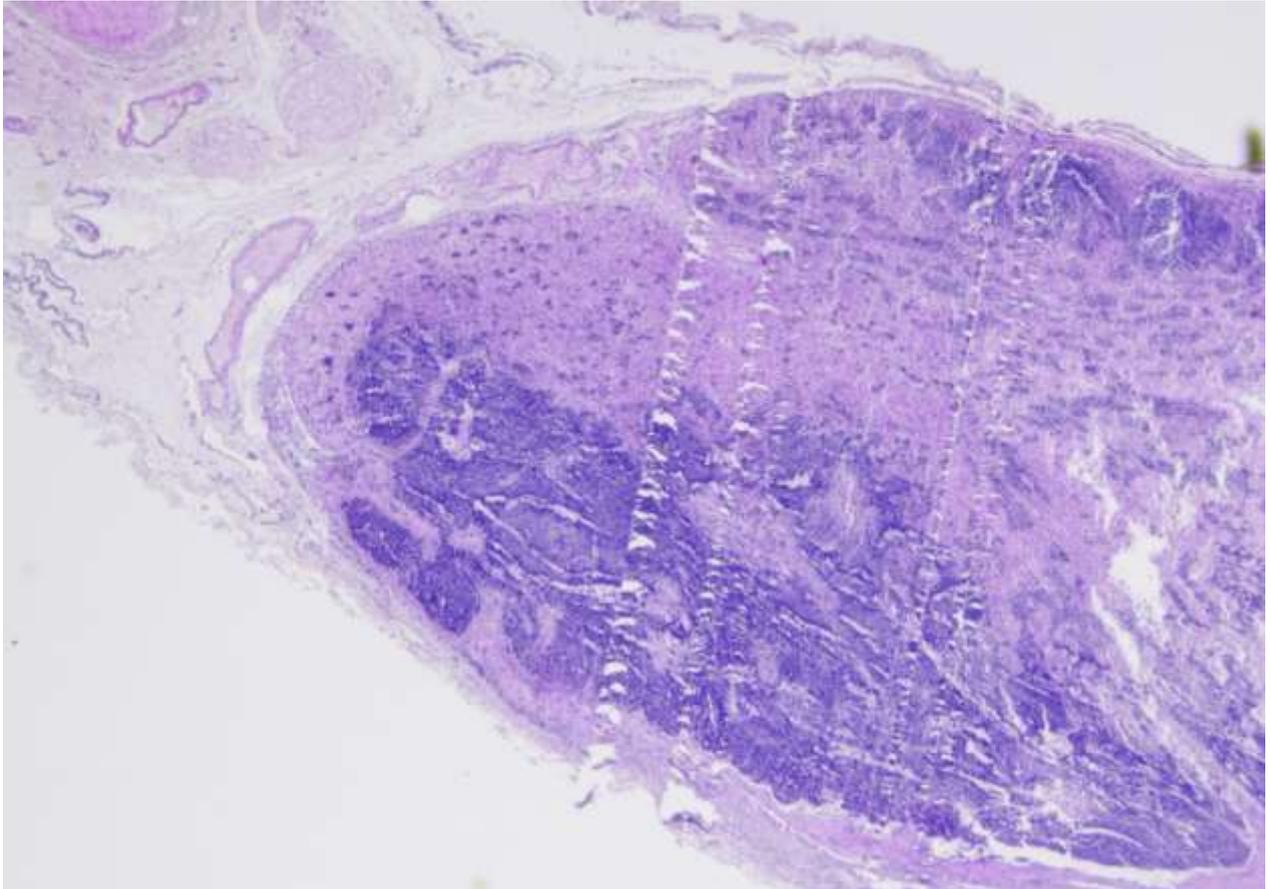


Figure 11 : Artéfact de section sur la coupe d'un nœud lymphatique chez un chevreuil (Vet Diagnostics, 2019)

II.2.3. Les prélèvements cytologiques :

II.2.3.1 Intérêt des prélèvements cytologiques en faune sauvage :

La cytologie est définie comme l'examen morphologique microscopique d'amas cellulaires ou de cellules isolées, sortis de leur contexte tissulaire. C'est une analyse fréquemment utilisée en médecine vétérinaire notamment pour avoir un premier avis sur des masses cutanées, car c'est une pratique peu invasive. Elle peut également être utilisée en *post-mortem* sur des animaux de la faune sauvage.

En effet, la cytologie présente de nombreux avantages : c'est un examen facile, rapide, et peu coûteux. En autopsie, il peut être utilisé au « chevet du patient », puisque le matériel pour effectuer puis analyser un prélèvement est sommaire. Il suffit de posséder un microscope, une lame, un ensemble de coloration rapide et de quoi réaliser un prélèvement (seringue, aiguille, scalpel). C'est donc un prélèvement qui se fait en laboratoire plutôt que sur le terrain, du moins pour l'interprétation. La première lecture de la lame de cytologie peut donc être effectuée rapidement contrairement à l'histologie. La cytologie peut donc nous orienter vers

un diagnostic ou nous pousser à effectuer d'autres examens complémentaires et donc, de nouveaux prélèvements.

Il y a souvent une bonne corrélation entre l'histologie et la cytologie, et ses deux examens se complètent. La cytologie est meilleure dans la détection de certains agents infectieux comme les hémoparasites ou les chlamydias. Il est donc intéressant de réaliser des prélèvements cytologiques, notamment lorsque les prélèvements histologiques sont impossibles (absence de formol par exemple).

La cytologie présente néanmoins des défauts, notamment en comparaison avec l'histologie. Elle ne permet pas d'avoir des informations sur l'architecture tissulaire et donc le degré d'invasion d'un processus pathologique, s'il y en a un. Par ailleurs, la localisation d'une lésion observée en cytologie est parfois difficile. Enfin, elle ne permet pas de préciser le caractère invasif ou non d'une lésion (Fleury-Feith, Bernaudin, 2011).

II.2.3.2 Réalisation des différents prélèvements cytologiques :

Il y a plusieurs techniques pour réaliser des prélèvements cytologiques. Nous présentons ici les techniques les plus applicables en faune sauvage. Dans tous les cas, les prélèvements doivent être disposés sur des lames propres (et dans l'idéal neuves) afin d'éviter toute contaminations (McDonough, Southard, 2017).

II.2.3.2.1 L'impression :

Cette technique également appelée « calque » consiste à faire des empreintes d'un organe sur une lame de cytologie.

A l'aide d'une lame de bistouri, l'organe est incisé au niveau de la zone que nous voulons observer (sur une lésion par exemple). Puis, il faut apposer la pièce plusieurs fois sur du papier absorbant afin d'éliminer au maximum le sang qui peut gêner ensuite la lecture microscopique. Ensuite, grâce à une pince, la partie sectionnée de la pièce est appliquée plusieurs fois sur la lame (cf figure 12). Si plusieurs zones sont intéressantes, plusieurs applications de ces dernières peuvent être effectuées sur des parties différentes d'une même lame (McDonough, Southard, 2017).



Figure 12 : réalisation d'une lame de cytologie par impression d'organe (Themes, 2016) :

De nombreux organes peuvent être analysés grâce à cette technique. Nous pouvons par exemple citer l'impression de la partie épiphysaire du fémur qui peut permettre de voir les cellules de la moelle osseuse. Le fémur incisé au niveau de l'épiphyse peut être utilisé comme un stylo pour réaliser les impressions de moelle (McDonough, Southard, 2017).

11.2.3.2.2 Le raclage :

Cette technique est particulièrement intéressante pour les lésions sèches et sans relief, les lésions ulcérées ou au niveau de certaines surfaces comme la cornée ainsi que la conjonctive. Avec cette technique, seules les couches cellulaires superficielles sont échantillonnées. De ce fait, les cellules plus profondes peuvent ne pas être représentées, ce qui peut mener à un diagnostic erroné ou incomplet.

Pour réaliser ce raclage, il est conseillé d'utiliser une lame de bistouri émoussée. Grâce à elle, il faut effectuer des mouvements unidirectionnels et perpendiculaires à la surface de la lésion. Ce geste doit aller suffisamment profond, le mieux est de racler jusqu'à la rosée sanguine ou jusqu'à l'exsudation de fluide tissulaire (Pouletty, 2019).

11.2.3.2.3 La cytoponction à l'aiguille fine :

Cette technique est intéressante car elle permet de s'affranchir de l'inflammation superficielle que nous pouvons retrouver dans les cas de raclage et de calque, l'image cytologique est donc plus représentative de la lésion d'origine (Ramery, Layssol Lamour, 2016).

La cytoponction à l'aiguille fine nécessite, comme son nom l'indique, une aiguille de petit diamètre. En effet, pour avoir le plus de chance d'obtenir un matériel diagnostique, il faut une aiguille avec un biseau fin mais long. Cette dernière caractéristique est importante car la capillarité est inversement proportionnelle au diamètre. Par ailleurs, si une aiguille de plus gros diamètre est utilisée, cela accroît les risques de saignement. Or, dans ces situations, les

cellules d'intérêt sont diluées dans les cellules sanguines. Nous conseillons donc les aiguilles de 23 à 25 Gauge (Ramery, Layssol Lamour, 2016) ainsi qu'une seringue de 3 mL et plusieurs lames en verres. Le piston de la seringue doit être tiré sur environ 1 mL pour ensuite pouvoir expulser les cellules ponctionnées. La seringue permet également de stabiliser le geste et est également très utile en cas d'aspiration.

Les ponctions sont à privilégier pour les organes ou masses d'une épaisseur supérieure ou égale à un centimètre. Sinon, la ponction peut être combinée avec une aspiration. Le geste de la ponction, aussi appelé « carottage », consiste à pénétrer la peau lentement puis d'effectuer cinq à six aller-retours rapides dans une seule et même direction. Il ne faut pas changer de direction au cours de la ponction car cela augmente le risque de saignement. Il est néanmoins possible d'effectuer plusieurs ponctions avec plusieurs aiguilles et lames différentes. Une fois le geste réalisé, il faut expulser le matériel sur la lame de verre. Puis, à l'aide d'une autre lame, placée perpendiculairement à la première, il faut effectuer un geste d'étalement du matériel comme le montre la figure 13. Il faut toutefois être précautionneux dans cette étape et ne pas exercer une pression excessive lors de l'apposition de la deuxième lame (Rannou, 2018).

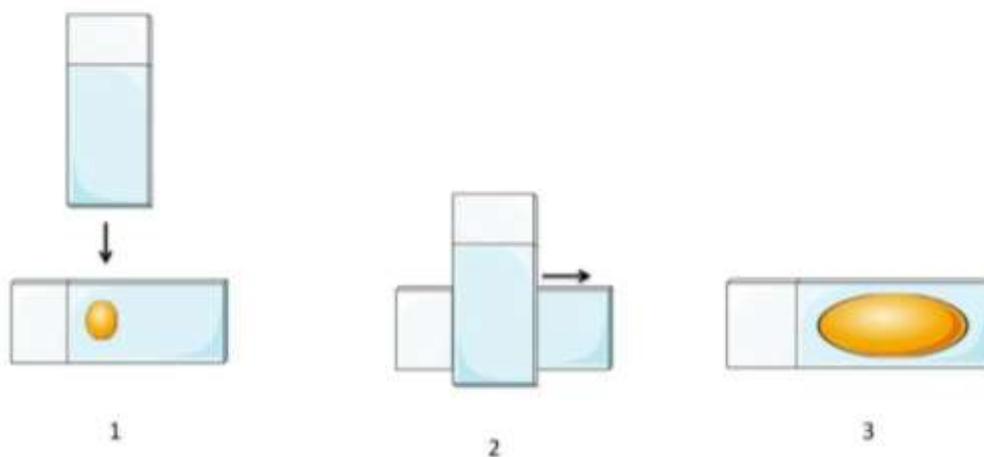


Figure 13 : étalement d'un matériel de cytoponction prélevé à l'aiguille fine (Rannou, 2018) :

II.2.3.2.4 La cytologie liquide : le frottis :

Le liquide prélevé peut être de plusieurs nature : urine, sang, épanchement... Une fois prélevé, un liquide d'épanchement doit être gardé à +4°C dans un tube EDTA et analysé dans les 24 heures.

Pour ce qui est de la technique, elle est décrite dans la partie II.2.1.4.2.4, il suffit de remplacer la goutte de sang par un autre liquide si nécessaire.

II.2.3.2.5 L'écouvillonnage :

Nous pouvons utiliser cette méthode pour les lésions fistuleuses, le canal auriculaire, les narines, la cavité buccale... L'écouvillon qui sert au prélèvement doit être légèrement humecté avec une solution saline stérile (ex : NaCl 0,9%). Il faut ensuite frotter ou rouler le bout de l'écouvillon contre la surface à analyser. Enfin, le matériel obtenu est déposé sur une lame de verre grâce à un mouvement de roulement (Pouletty, 2019).

II.2.3.3 Conservation des prélèvements cytologiques :

Une fois prélevés et appliqués sur une lame de verre, les prélèvements doivent subir deux autres étapes avant d'être analysés :

- Le séchage : les lames sont séchées à l'air libre pendant quelques minutes. Attention, il ne faut pas accélérer le séchage avec un élément produisant de la chaleur comme un sèche-cheveux ou une allumette car cela détruit une partie des cellules.
- La coloration : le plus souvent une coloration rapide de type Romanowsky est utilisée. Elle est constituée de trois bacs de trempages différents, un fixateur et deux colorants (un éosinophilique et un basophile). La lame doit être trempée 30 secondes dans chaque bac en effectuant des mouvements d'aller et retours. Entre chaque bac, il faut laisser la lame s'égoutter pendant quelques secondes. Après le dernier bain, et après un égouttage de 10 secondes, il est possible de rincer la lame avec de l'eau distillé. D'autres colorations sont également réalisables en cytologie comme celles de Gram, Ziehl-Nielsen... (McDonough, Southard, 2017).

Une fois colorée, les lames peuvent être observées au microscope.

De plus, il est possible de conserver les lames de cytologie sur du long terme. Une lame colorée peut être gardée à vie sans dégradation. Toutefois, sans protection nous ne pourrions la visualiser à l'immersion plus d'une fois. En effet, pour observer une lame à l'objectif à immersion, il est nécessaire d'y apposer une goutte d'huile qu'il faudra essuyer après observation. Sans protection il y aura alors une perte de matériel lors de cette étape. Pour éviter cette situation, les lames peuvent être fixées dans des solutions à base de méthanol ou

de toluène comme le système Entellan®. Une fois la solution fixante déposée sur la lame, il faut coller une lamelle sur cette dernière. Ceci fait, la lame sera protégée et pourra donc être visualisée de multiples fois à l'immersion.

II.2.4. Les prélèvements toxicologiques :

II.2.4.1 Intérêt des examens toxicologiques et signes d'appels :

L'exposition de la faune sauvage à des toxiques est fréquente. L'un des cas les plus connus concerne la mortalité massive de vautours en Inde et au Pakistan causée par une intoxication au diclofénac (Oaks et al., 2004). Cet anti-inflammatoire était couramment utilisé en médecine vétérinaire dans ce pays pour traiter les bovins. Ces derniers ne sont culturellement pas consommés en Inde, les carcasses étaient donc laissées à l'équarrissage et servaient de nourriture aux vautours. Or il s'est avéré que le diclofénac résiduel dans les carcasses de bovins récemment traités entraînait une insuffisance rénale aigue mortelle chez ces oiseaux de la famille des accipitridés, qui comme tous les rapaces sont très sensibles à différents agents toxicologiques.

Les signes d'appels qui peuvent nous faire penser à une cause toxicologique en faune sauvage sont les suivants :

- Une mortalité massive et potentiellement multi-espèces, souvent autour d'un lieu précis (Gwaltney-Brant, 2016). Dans la grande majorité des cas, une seule espèce est ciblée via l'utilisation d'appâts. Toutefois, il est très difficile de limiter l'accès au piège à une seule espèce et il y a donc des dommages collatéraux.
- Tout appât ou molécule toxique trouvé près d'une carcasse doit faire suspecter une intoxication. Il conviendra de prélever ces pièges ou produits (cf partie I.1.1.1.1) pour confirmer nos hypothèses.
- Si des convulsions ont été observées en ante-mortem, il faut penser à une intoxication, aux carbamates par exemple.
- Tout contenu stomacal suspect, notamment les restes riches en graisses, est à analyser
- Les signes d'exposition aux antivitamines K (pétéchies, anémie, hémorragie...) sont également des signes d'appels.
- Les cadavres sans lésions ou avec une cause de décès indéterminée sont aussi des bons candidats à une intoxication.
- Enfin, sur des animaux ayant ingéré des plombs de chasse ou de pêche ou ayant été tirés (objectivés au préalable via une radiographie), une mesure de la plombémie est intéressante. Il s'agit notamment de rapaces et d'ansériformes.

Par ailleurs, les analyses toxicologiques sont rarement des examens de première intention **mais les signes d'expositions** à des matières toxiques étant extrêmement polymorphes, il est important de pouvoir pratiquer des analyses toxicologiques à posteriori si les examens complémentaires précédents se sont révélés infructueux. Ainsi, nous conseillons de prélever certains organes (cf partie II.2.4.2) **et de les conserver congelés jusqu'à une éventuelle utilisation.**

II.2.4.2 Les prélèvements toxicologiques en condition idéales :

Dans l'idéal, il faudrait réaliser les prélèvements sur un cadavre frais. Toutefois, le travail sur un individu préalablement congelé est possible. Les prélèvements toxicologiques sont parmi les derniers à être réalisés . En effet, même si un travail en conditions stériles est conseillé, **il n'est pas impératif.**

II.2.4.2.1 Que prélever en toxicologie et en quelle quantité ?

Selon les analyses à réaliser et les toxiques recherchés, les organes à prélever ainsi que leurs **quantités diffèrent. Ce dernier paramètre varie selon la technique d'analyse et dépend également du laboratoire.** Par exemple, le laboratoire de toxicologie ToxLab demande une quantité minimale de 5 g ou 5 mL pour la plupart de ses analyses alors que les quantités décrites par Gwaltney-Brant en 2016, sont beaucoup plus importantes notamment pour le foie et les reins. Il préconise en effet le **prélèvement d'au moins 300 g** (Gwaltney-Brant, 2016). **Nous conseillons donc de s'informer auprès du laboratoire de toxicologie** auquel les échantillons seront envoyés afin de savoir quelle quantité conserver et envoyer. Bien entendu, plus les tests sont nombreux et plus la quantité d'organe ou de de liquide à garder est importante.

Pour des animaux de petite taille, l'astuce consiste à réaliser un « pool » du même organe chez plusieurs individus afin d'avoir un volume suffisant pour les analyses.

Dans le Tableau 1, nous avons listé les différents prélèvements utiles en toxicologie ainsi que leurs usages selon les toxiques recherchés. En ce qui concerne la quantité minimale d'échantillon, comme évoqué ci-dessus, les valeurs sont très larges et dépendent fortement du laboratoire d'analyse.

Tableau 1 : Présentation des différents prélèvements post-mortem réalisables en cas de suspicion d'intoxication (Arboucalot, 2017 ; Gwaltney-Brant, 2016 ; Dinis-Oliveira et al., 2010) :

Prélèvements	Quantité	Conditionnement	Température de conservation	Analyses possibles
Foie	5 – 300 g	• Récipient rigide	• 4°C / -20°C	Pesticides, Mx L Médicaments, Alca, Cya, Mycotx, AVK
Rein	5 – 300 g	• Récipient rigide	• 4°C / -20°C	Mx L, Plantes Médicaments, Eth Gly
Cerveau	½ encéphale	• Récipient rigide	• 4°C / -20°C • 4°C seulement pour tester les acétylcholinestérase	Ac Cho, Na, Pesticides
Poumon	Lobe entier / Poumon entier	• Récipient rigide hermétiquement fermé (chasser l'air)	• 4°C	Agents volatils
Rate	5 – 100 g	• Récipient rigide	• 4°C / -20°C	Barbituriques, Paraquat
Tissu adipeux	5 – 300 g	• Récipient rigide	• 4°C / -20°C	OrgCh, PCB, Médicaments, Eth Gly
Contenu intestinal ou stomacal	5 – 500 g	• Récipient rigide	• 4°C / -20°C	Pesticides, Mx L Médicaments, Alca, NH ₄ , Mycotx, Cya
Urine	5 – 10 mL	• Récipient rigide	• 4°C	Pesticides, Mx L Médicaments, Alca
Sang total	5 – 10 mL	• Tube EDTA	• 4°C	Cya, AVK, Ac Cho, CO, Mx L, Pesticides
Plasma	5 – 10 mL	• Récipient rigide	• 4°C	Médicaments, Eth Gly, Mx L, AVK, OrgCh
Humeur vitrée	5 – 10 mL	• Récipient rigide	• 4°C / -20°C	K, NH ₄ , Mg, NO ₃
Poils	25 – 100 poils	• Sac en papier	• Température ambiante	Se, Hg
Os long	Os entier	• Sac en papier	• Température ambiante	Pb

Abréviations: Ac Cho = acétylcholinestérase ; Alca = Alcaloïdes ; AVK = antivitamines K ; CO = Monoxyde de carbone ; Cya = Cyanure ; Eth Gly = Ethylène glycol ; K = Potassium ; Hg = Mercure ; Mg = Magnésium ; Mx L = Métaux lourds ; Mycotx = Mycotoxines ; NH₄ = Ammoniac ; NO₃ = Nitrate ; OrgCh = Organochlorés ; Pb = Plomb ; Se = Sélénium

Lorsque nous ne savons pas quel élément rechercher en *post-mortem*, nous conseillons de prélever un morceau de foie et de rein et du sang. Lors de suspicion d'intoxication au plomb, il faut prélever en plus un os long comme le fémur. Le prélèvement d'humeur vitrée est intéressant pour le dosage de potassium, de magnésium, de nitrites ou d'ammonium. Enfin, comme évoqué dans la partie II.2.4.1, lors de suspicion d'intoxication d'origine alimentaire, un prélèvement du contenu stomacal est indispensable.

Détaillons maintenant comment réaliser les différents prélèvements de manière optimale.

II.2.4.2.2 Le prélèvement du foie pour des analyses toxicologiques :

Le foie est probablement l'organe le plus important à prélever en toxicologie. S'il ne fallait réaliser qu'un seul prélèvement, ce serait celui-ci. En effet, le foie est un organe filtre, et peut donc retenir tout ou partie de nombreux médicaments, pesticides ou minéraux (Berny, Queffelec, 2014). Il est notamment intéressant chez les ruminants, chez lesquels le contenu stomacal est très volumineux. Il est donc difficile d'avoir un prélèvement représentatif de l'ensemble de ce contenu.

Le volume à prélever est assez variable et dépend de plusieurs paramètres : le format de l'animal, le nombre d'analyses à réaliser en toxicologie et les autres examens complémentaires à réaliser sur ce même organe. Comme pour la plupart des grandes catégories d'analyses, en toxicologie, l'idéal serait de travailler sur un organe entier. Toutefois, vu l'importance de cet organe pour tous les tests, il paraît peu probable de disposer d'un foie entier pour la toxicologie. Nous préconisons donc de prélever au moins 5 g de foie pour chaque analyse toxicologique à réaliser. Ainsi un échantillon d'au moins 25 g serait le minimum pour pouvoir réaliser à minima quatre à cinq tests différents.

Enfin, comme tout prélèvement toxicologique, l'échantillon de foie doit être représentatif de l'organe. Il ne faut donc pas prélever un morceau qui diffère du reste de l'organe. Il faut également éviter tout prélèvement proche de la vésicule biliaire, car c'est une zone d'élimination des molécules. Les prélèvements effectués à proximité sont donc plus riches en molécules que le reste du foie et ne sont pas représentatifs des concentrations réelles de l'organe (Berny, 2019 : Communication personnelle).

II.2.4.2.3 Les prélèvements de tissu rénal et d'urine pour des analyses toxicologiques :

L'urine est un liquide biologique essentiel en toxicologie ante-mortem (pour la recherche de stupéfiants, de chloralose, d'euthanasiants...) mais très difficile à trouver en *post-mortem*, hormis sur un animal frais. Dans ce cas, il faut réaliser une cystocentèse à l'aide d'une aiguille de 21 à 23 Gauge (Grégoire, 2012) pour un animal du format d'un chat ou d'un chien. Une

seringue de plus petit diamètre peut être utilisée sur des animaux plus petits à la vessie fragile. **En revanche, il ne faudrait pas dépasser un diamètre de 21 Gauge pour les vessies d'animaux plus gros afin de ne pas entraîner une rupture vésicale et un déversement de l'urine dans le corps.** Une seconde méthode peut également être utilisée, il faut réaliser une petite incision **en partie dorsale de la vessie puis recueillir l'urine dans un récipient stérile** tout en évitant la contamination des autres organes. Dans tous les cas, il faut faire attention à ne pas percer la vessie lors de la découpe du corps et donc ne pas inciser trop profondément la peau puis la paroi abdominale.

Pour les reins, comme pour le foie, il faut prélever au moins 5 g de tissu par analyse à un **endroit représentatif de l'organe avec à la fois du cortex et de la médulla** (Berny, Queffélec, 2014).

II.2.4.2.4 Les prélèvements sanguins pour des analyses toxicologiques :

Pour les prélèvements *ante-mortem* en toxicologie, le sang et notamment le plasma sont les supports les plus utilisés pour toutes les analyses concernant les métaux lourds ainsi que de **nombreux produits passant dans le sang (médicaments, raticides...)** (Berny, Queffélec, 2014). Toutefois, en *post-mortem* il est compliqué d'obtenir du sang et celui-ci est souvent coagulé et moins fluide (Dinis-Oliveira et al., 2010).

A l'exception des animaux fraîchement décédés, chez qui une simple prise de sang permet **d'avoir un bon prélèvement** (cf partie II.2.6.2.1), il y a quelques sites à privilégier pour obtenir du sang en *post-mortem* :

- **Le cœur et, en particulier, le ventricule droit** est un site important. En effet, le sang y est moins coagulé que dans **d'autres portions vasculaires. La technique de prélèvement** est décrite dans la partie II.2.6.2.2. Toutefois, le sang cardiaque est souvent hétérogène, il peut contenir une concentration plus importante de certains **toxiques comme la digoxine, les morphiniques ...** (Gwaltney-Brant, 2016). Ceci est le résultat d'un effet cumulatif qui découle du retour sanguin au cœur au moment de la mort de l'animal.
- La veine fémorale **est l'un des derniers sites soumis à la redistribution sanguine *post-mortem*** (Dinis-Oliveira et al., 2010) et est donc un site de choix si nous cherchons à quantifier précisément la dose de toxique. Toutefois, **en médecine vétérinaire, ce n'est souvent pas la quantification mais simplement la détection qui est importante** (Gwaltney-Brant, 2016).
- La rate : **s'il n'y a pas assez de sang, cet organe est très intéressant.** Son utilisation est décrite chez l'homme pour le dosage des xénobiotiques en absence de sang

cardiaque (Dinis-Oliveira et al., 2010). Nous conseillons de prélever 30 g de rate. Ce prélèvement ne permet pas de quantifier mais simplement de détecter des toxiques.

II.2.4.2.5 Le prélèvement d'humeur vitrée pour des analyses toxicologiques :

L'humeur vitrée, ou corps vitré, est le gel situé entre la rétine et le cristallin. Il peut être intéressant de le prélever afin de doser le potassium, les nitrites, les nitrates, le magnésium ou l'ammoniac (Gwaltney-Brant, 2016). De plus, c'est un lieu peu contaminé en *post-mortem*.

Pour prélever de l'humeur vitrée, nous conseillons d'utiliser une seringue de 5 à 10 mL ainsi qu'une aiguille de 20 Gauge. Il faut insérer cette dernière dans le canthus externe et l'enfoncer jusqu'au milieu de l'œil comme nous pouvons le voir sur la figure 14. Ensuite, il faut aspirer doucement l'humeur vitrée (Dinis-Oliveira et al., 2010), puis vider le contenu ainsi aspiré dans un pot de 10 mL bien fermé.



Figure 1415 : Prélèvement post-mortem d'humeur vitrée chez un bovin (Department of Agriculture and Food Western Australia, 2019) :

II.2.4.2.6 Les autres prélèvements intéressants pour des analyses toxicologiques :

Certains prélèvements sont moins importants ou ont déjà été évoqués plus haut mais conservent un intérêt en toxicologie :

- Le contenu stomacal : **il peut être intéressant à prélever en cas d'odeur anormale, de contenu grasseux ou d'aspect suspect.** Toutefois il n'a que peu d'intérêt après 24 à 48 heures post-mortem (Berny, Queffelec, 2014). Chez les ruminants, il faut privilégier la caillette au rumen car le contenu est plus petit, plus homogène et donc plus représentatif.
- Les vomissures : elles peuvent également être prélevées. Elles ont une grande valeur si elles sont prélevées rapidement car elles sont très concentrées en substances toxiques (si elles sont présentes). En revanche, elles sont beaucoup moins intéressantes une fois dégradées. **L'analyse externe des vomissures peut également s'avérer fructueuse si nous arrivons à distinguer certains éléments étrangers qui peuvent orienter notre recherche.**
- Le cerveau : Certains auteurs conseillent de de conserver un hémisphère cérébral **pour les analyses toxicologiques, notamment pour la recherche d'agents lipophiles** comme les PCB, les organochlorés ou les acétylcholinestérases. Pour le dosage de ces dernières, le cerveau ne doit pas être congelé (Gwaltney-Brant, 2016). Toutefois, il est très intéressant de conserver les deux hémisphères cérébraux **pour l'analyse histologique** (cf partie II.2.2.4.1.6). Nous préconisons donc de garder le cerveau pour **l'histologie** et de prélever du tissu adipeux pour la recherche de substances lipophiles.
- Le tissu adipeux : **lorsqu'il est présent, il peut être utilisé pour la recherche de substances lipophiles** comme celles trouvées dans le cerveau.
- Les os longs : Ils servent pour la mesure de la plombémie chronique car ils constituent un lieu de stockage (Berny, 2019 : Communication personnelle). **Le fémur est l'os long** le plus intéressant dans ce contexte, son prélèvement est donc à privilégier.
- Les prélèvements environnementaux : cela regroupe de nombreux éléments comme **les appâts, l'eau, les plantes...qui** peuvent être incriminés dans certaines intoxications. Les différents prélèvements ainsi que leurs quantités et leurs moyens de conservation sont regroupés dans **l'Annexe 2**.

II.2.4.2.7 Les prélèvements à éviter pour des analyses toxicologiques :

Il y a donc énormément de prélèvements réalisables pour des analyses toxicologiques. Nous privilégierions cependant le foie, le contenu stomacal, **le rein, l'humeur vitrée et le sang.**

En revanche, certains échantillons comme les poils, la peau, le contenu ruminale (car trop hétérogène) (...) n'ont que très peu d'intérêt en toxicologie.

II.2.4.3 Conservation et envoi des prélèvements toxicologiques :

Les prélèvements toxicologiques doivent être placés individuellement dans des récipients stériles et fermés. Il **peut s'agir de pot à prélèvement ou de sachet isotherme**. Les récipients en verre sont à proscrire car trop fragiles et résistent mal à la congélation. Il en va de même des pots en polystyrène (Gwaltney-Brant, 2016). Par ailleurs, les prélèvements liquidiens ne doivent pas rester dans la seringue de prélèvement car le risque de perte est trop important. **Il faut donc les placer également dans un pot à prélèvement à l'exception des prélèvements sanguins** (sang total et plasma) qui sont à conserver dans des tubes contenant des anti-coagulants (cf partie II.2.6.3). Il est primordial de séparer les prélèvements pour éviter toute contamination croisée entre organe.

La plupart des prélèvements peuvent être conservés au réfrigérateur à **+4°C jusqu'à 48 heures après l'échantillonnage**. Sur le terrain, cette température peut être assurée par une glacière ou un emballage rigide avec des blocs réfrigérants (cf partie III.4). Ensuite, ils doivent être congelés à **-20°C à l'exception** du sang total qui doit être conservé à +4°C et donc rapidement analysé avant dégradation (Berny, Queffelec, 2014).

Attention, il est impossible de réaliser une quelconque analyse toxicologique sur un prélèvement conservé dans du formol !

Lors de l'envoi dans un laboratoire de toxicologie, les prélèvements doivent être protégés par un triple emballage (cf partie III.4.3) et conservés à une température appropriée. Il est possible de mettre plusieurs prélèvements dans le même colis mais cela nécessite la mise en place de rembourrage ainsi que de matériel absorbant pour prévenir toute fuite.

II.2.5. Les prélèvements en génétique :

Dans les études génétiques modernes, les chercheurs essayent de minimiser leur impact sur les animaux vivants en maximisant les prélèvements non invasifs comme les pièges à poils, la récolte de fèces... Cependant, cela suppose un risque important de contaminations croisées et ainsi de mauvaises identifications ou du moins, des résultats peu probants. Ici, le travail sur des cadavres permet de s'affranchir du risque de contamination croisée puisque nous savons ce que nous prélevons et sur quel individu.

II.2.5.1 Intérêt des prélèvements génétiques en faune sauvage :

Les prélèvements génétiques en faune sauvage revêtent plusieurs intérêts :

- Recenser et identifier les individus d'une espèce donnée.
- Participer à des suivis de populations. Dans le monde d'aujourd'hui où les changements climatiques et environnementaux sont nombreux, l'étude de la génétique d'une population est particulièrement intéressante pour évaluer la réponse à ces changements (Zemanova, 2019).
- Évaluer la diversité génétique d'une espèce donnée.
- Constituer une collection biologique de prélèvements. C'est notamment le cas de nombreux muséums où nous pouvons trouver d'immenses collections d'échantillons génétiques.

II.2.5.2 Les prélèvements *post-mortem* utiles pour des analyses génétiques :

II.2.5.2.1 Quels sont les meilleurs prélèvements pour les analyses génétiques ?

Comme pour de nombreuses analyses *post-mortem*, le matériel biologique nécessaire aux examens génétiques dépend du laboratoire d'analyse avec lequel nous voulons travailler. Il est donc important de contacter un laboratoire partenaire avant de prélever les échantillons pour la génétique. Nous allons cependant dresser une liste indicative des échantillons à privilégier dans le cadre d'analyses génétiques fondée sur la littérature (Forensic Working Group, 2014). Par ordre de priorité, nous avons :

- Les tissus
- Le sang
- Les poils et les plumes
- Les dents
- Les os
- Les fèces

Plus les échantillons sont bas dans cette liste et moins leur qualité d'ADN est bonne. Il est donc essentiel d'être très rigoureux lors du prélèvement de phanères, des dents, d'os ou des fèces afin de compenser ce manque qualitatif.

D'autres types d'échantillons sont cités mais ne présentent que peu d'intérêt, par exemple le contenu intestinal. D'autres sont difficiles à prélever en post-mortem. Ainsi, la salive ne constitue pas un prélèvement de premier choix car elle disparaît très vite après la mort de l'animal via les mécanismes d'évaporation ou de dessiccation, et peut être contaminée par d'autres molécules.

II.2.5.2.2 Les prélèvements génétiques en condition idéales :

II.2.5.2.2.1 Les prélèvements tissulaires pour des analyses génétiques :

Comme nous l'avons expliqué précédemment, les tissus sont parmi les meilleurs prélèvements pour des analyses génétiques. Toutefois, certains tissus sont plus intéressants que d'autres. Idéalement, il faut favoriser les organes qui ont une bonne qualité d'acides nucléiques et qui sont les moins sujets à la décomposition (Paetkau, 2010). Selon les laboratoires d'analyses, différents organes sont conseillés. Cela dépend également des moyens de conservation des prélèvements comme nous allons le voir par la suite.

Pour réaliser un prélèvement génétique, la première tâche est de désinfecter la surface de l'organe à prélever à l'aide d'une solution alcoolique (d'éthanol à 70°) ou de chlorhexidine. L'organe à prélever ainsi que le format de l'échantillon dépendent beaucoup du mode de conservation :

- Si nous disposons de papier buvard, il vaut mieux prélever du muscle, du foie ou du rein. L'incision doit être effectuée avec une lame de scalpel préalablement stérilisée pour éviter les contaminations croisées. Il faut découper un cube de quelques centimètres de côté. Celui-ci doit ensuite être appliqué avec vigueur sur le papier buvard comme nous l'expliquons dans la partie II.2.1.3.2. Enfin, le papier doit sécher pendant 30 minutes à 3 heures à température ambiante dans un milieu sans humidité.
- Si nous ne disposons pas de papier buvard, les prélèvements sont à effectuer dans les zones les moins sensibles au phénomène de décomposition. Les organes les plus souvent prélevés sont les coussinets plantaires, les muscles ou l'extrémité de l'oreille (chez les petits mammifères) (Paetkau, 2010). La peau, le foie et les reins sont également des zones de prélèvements conseillées chez les mammifères (Vogelneust et al., 2008). Chez les oiseaux, le cerveau et le foie sont les organes avec l'ADN de meilleure qualité (Gaur et al., 2017). Enfin, chez les reptiles, les écailles, ainsi que la peau chez les serpents, semblent être de bons prélèvements génétiques. Dans tous

les cas, les prélèvements doivent être effectués de manière stérile avec des instruments qui le sont. Les organes doivent être découpés en pièces de 0,5cm×0,5cm×1 cm (Vogelnest et al., 2008). Les méthodes de conservation sont décrites dans la partie II.2.5.3.

II.2.5.2.2.2 Les prélèvements sanguins pour des analyses génétiques :

Les prélèvements sanguins sont très utilisés en génétique chez les oiseaux et les reptiles. En effet, chez eux les hématies sont nucléées et contiennent donc une grande quantité d'ADN (Gaur et al., 2017) contrairement aux mammifères.

Pour ce qui est du prélèvement en lui-même, les différentes techniques pour collecter du sang sont décrites dans la partie II.2.6.

II.2.5.2.2.3 Les prélèvements des phanères pour des analyses génétiques :

Par phanères nous entendons ici les poils chez les mammifères et les plumes chez les oiseaux. Pour les premiers, le mieux est de les arracher à l'aide d'une pince ou d'un clamp après avoir nettoyé la zone avec de l'alcool à 70°. Attention, il ne faut pas couper les poils avec une paire de ciseaux car cela casse le poil en deux et laisse la racine du poil sur le corps de l'animal. Or c'est dans cette zone que se situe la plus grande partie de l'ADN. En termes de quantité, il faut prélever au moins 20 à 25 poils non souillés par des contenus extérieurs. Les poils sont ensuite disposés dans une enveloppe en papier. Préservés de l'humidité, ils peuvent être conservés à température ambiante pendant plusieurs mois.

Pour les plumes, plus le cadavre est frais et meilleur sera le prélèvement. Les plumes possédant un large rachis ainsi que de larges vexilles sont celles qui ont la plus grande quantité d'ADN. Les plumes possédant des barbes intactes et un calamus transparent fournissent un ADN de bonne qualité. Il faut arracher les plumes, à l'aide d'une pince ou d'un clamp, au niveau de l'extrémité des vexilles, de manière à ne pas abimer le rachis. Une fois obtenue, la plume est placée dans un tube contenant de l'éthanol à 70°. Dans ce mélange, elle pourra être conservée plusieurs mois à température ambiante ou plusieurs années à +4°C (Gaur et al., 2017).

Pour les poils et les plumes, l'idéal pour éviter toute contamination est de ne pas les prendre par la base.

II.2.5.2.2.4 Les prélèvements osseux pour des analyses génétiques :

Il n'y a pas d'os à prélever en particulier, bien qu'un os long soit plus intéressant en génétique car il contient souvent plus d'ADN.

La technique pour réaliser un bon prélèvement osseux est décrite en partie II.2.7.3. L'étape de découpe décrite n'est pas obligatoire, elle permet simplement de diminuer la taille du prélèvement pour le stockage ou l'envoi. Toutefois l'idéal serait d'envoyer l'os en entier afin que le laboratoire d'analyse effectue lui-même une découpe tout en gardant un maximum d'informations et en limitant la contamination.

II.2.5.2.2.5 Les prélèvements des fèces pour des analyses génétiques :

Les fèces doivent être prélevées dans les 72 heures après émission pour conserver un intérêt pour des analyses génétiques. Naturellement, plus l'échantillonnage est frais et plus la qualité de l'ADN sera importante. C'est souvent la partie externe des selles qui contient l'ADN, il faut donc s'assurer que cette partie est bien prélevée lors de l'échantillonnage (Forensic Working Group, 2014).

L'idéal pour collecter des excréments les plus frais possible peut être de les prélever au niveau de l'extrémité même du rectum si le tube digestif n'est pas trop dégradé. Les selles doivent être prélevées à l'aide d'une cuillère ou d'une pince. Le matériel doit être sec et avoir été stérilisé préalablement.

Les prélèvements sont ensuite déposés dans un pot à prélèvement ou un sachet isotherme selon le devenir et la conservation choisie.

II.2.5.3 Conservation des prélèvements génétiques :

La conservation des prélèvements génétiques vise avant tout une préservation **de l'ADN en évitant la dégradation enzymatique des acides nucléiques ainsi que toutes formes d'oxydation** (Nagy, 2010). Les méthodes de conservation dépendent également du type de prélèvements que nous voulons conserver. Par exemple, les poils se conservent très bien **dans une enveloppe à température ambiante mais ce n'est pas le cas d'autres prélèvements.**

La première mesure simple à appliquer pour inactiver les enzymes consiste à **éliminer l'eau des organes.** De nombreuses méthodes de conservation des acides nucléiques fonctionnent sur ce principe (Nagy, 2010).

La première méthode est la dessiccation. Ce mécanisme est à mettre en place dès la réalisation du prélèvement. Il faut éviter toute humidité et maintenir une atmosphère sèche, avec une température ne dépassant pas les +4°C. L'utilisation de gel de silice et un stockage

dans une enveloppe papier sont tout à fait possibles. Cette méthode est d'autant plus efficace que l'échantillon d'organe prélevé est fin. C'est pourquoi nous conseillons des prélèvements de dimensions n'excédant pas les 0,5cm×0,5cm×1cm. Les tissus les moins rapidement dégradés par les enzymes sont les coussinets plantaires ou les muscles. Ils font partis des meilleurs échantillons si nous souhaitons utiliser cette méthode de conservation.

La seconde méthode utilisée ici consiste à plonger les prélèvements dans de l'éthanol à 95° ou absolu. Cette molécule permet une conservation longue durée des acides nucléiques. La préservation des prélèvements est donc assurée pendant plusieurs mois à température ambiante et à très long terme si le pot contenant l'éthanol et l'échantillon est congelé (Ramón-Laca et al., 2015). Cette technique est particulièrement employée pour les fèces et les plumes. Elle est également utilisée pour la conservation des tissus. D'autres solutions peuvent être également employées pour préserver les acides nucléiques. La plus utilisée est le diméthylsulfoxyde (DMSO) dilué à 20% en solution saline qui permet une bonne extraction d'acides nucléiques même deux ans après le prélèvement d'échantillon tissulaires (Kilpatrick, 2002). Au contraire, le formol ne permet pas de travailler dans de bonnes conditions avec les acides nucléiques car il entraîne la formation de ponts protéiques qui fragmentent l'ADN lors de son extraction (Eros, Great Barrier Reef Marine Park Authority, 2007 ; McDonough, Southard, 2017). Il est donc fortement déconseillé d'utiliser ce produit pour conserver des prélèvements génétiques.

Une troisième méthode courante est l'utilisation des cartes FTA® . Intéressantes pour conserver les acides nucléiques issus du sang ou des organes, elles peuvent être conservées à température ambiante (dans des enveloppes) pendant plusieurs mois voire années à condition d'être bien sèches (cf partie II.2.1.3.2) Il existe également d'autres papiers buvards fonctionnant sur le même principe.

Enfin, la congélation des prélèvements est une des dernières méthodes que nous conseillons. Garder le prélèvement à -20°C permet une conservation à moyen terme mais seule une congélation à -80°C garantit une conservation à long terme (Nagy, 2010).

II.2.6. Les prélèvements sanguins :

Les prélèvements de sang font partie des prélèvements les plus fréquents sur les animaux vivants. En revanche, ils sont beaucoup moins exploités en post-mortem. En effet, hormis sur des animaux fraîchement décédés, **il est bien plus difficile d'obtenir du sang de bonne qualité** sur un cadavre. Il existe cependant certaines techniques que nous allons détailler et qui **permettent d'obtenir** quelques résultats intéressants.

II.2.6.1 Intérêt des prélèvements sanguins pour les analyses *post-mortem* en faune sauvage :

Les prélèvements sanguins ont plusieurs utilités :

- **En génétique, le sang est un prélèvement de choix, même s'il est aujourd'hui moins utilisé.** En effet, pour les études génétiques, qui sont le plus souvent *ante-mortem*, les scientifiques essaient de diminuer les prélèvements invasifs dont font partie les prises de sang.
- En toxicologie, le sang, et surtout le plasma extrait de celui-ci, sont utilisés pour la recherche de nombreux xénobiotiques comme les antivitamines K, les **alcaloïdes...** (Arboucalot, 2017).
- En parasitologie, la recherche de parasites sanguins peut se faire sur des frottis sanguins. Cependant, comme expliqué dans la partie II.2.1.4.2.4, **cette étude n'a que peu d'intérêt sur** des cadavres non frais.
- **En bactériologie, l'étude de frottis sanguin permet de détecter** certaines bactéries comme les bacilles charbonneux (cf partie III.2.2).
- En sérologie, le sérum est la matrice de base pour de nombreux tests diagnostiques.
- **En hématologie et en biochimie, le sang permet d'obtenir** de nombreuses indications **sur un possible état morbide ayant précédé la mort.** Cela permet également d'établir des valeurs usuelles pour chaque espèce, qui pourront ensuite être réutilisées sur des animaux vivants.

Ainsi, même si les prélèvements sanguins en *post-mortem* ne sont pas les meilleurs échantillons, ils conservent néanmoins un intérêt pour certaines analyses. Il ne faut donc pas les négliger.

II.2.6.2 Les différentes techniques de prélèvements sanguins en *post-mortem* :

Nous allons distinguer les techniques de prises de sang effectuées directement après la mort de l'animal, sur cadavre frais, de celles pratiquées sur des animaux morts depuis plus de temps.

II.2.6.2.1 Les techniques de prises de sang sur des animaux fraîchement décédés :

Les techniques de prises de sang sont similaires à celles pratiquées du vivant de ces individus. Ces prélèvements sanguins concernent pour la majeure partie des animaux abattus à la chasse ou sur décision des autorités. Il est rare d'assister à la mort d'un animal en dehors de ces cas de figures.

Ces techniques peuvent toujours être appliquées même lorsque nous ne connaissons pas la date et l'heure de la mort de l'animal. Toutefois, le résultat n'est absolument pas garanti dans ces cas-là puisque le sang a tendance à coaguler rapidement et devenir beaucoup moins fluide en post-mortem.

Contrairement à des prélèvements sur des animaux vivants, le volume sanguin prélevé ne doit pas être rationné. Il est donc possible de prélever plus de 10% du volume sanguin chez un individu. Plus le volume prélevé est important et plus le nombre d'analyses possibles augmente. Dans l'idéal, un volume de 5 mL de sang est intéressant, le volume peut monter jusqu'à 10 mL si nous voulons réaliser des analyses plus nombreuses.

Avant tout prélèvement, il est nécessaire de dégager la zone de prélèvement, si nécessaire en enlevant quelques plumes ou en tondant les poils. Puis, il faut la désinfecter avec de l'éthanol à 70° ou encore de la chlorhexidine diluée afin d'avoir un prélèvement le plus stérile possible.

II.2.6.2.1.1 *Les techniques de prises de sang chez les oiseaux :*

Le matériel pour les prises de sang chez les oiseaux dépend de la taille des individus. Généralement, nous préconisons l'utilisation d'aiguille de 22 à 26 Gauge chez la plupart des espèces.

Les sites de prélèvements les plus fréquemment utilisés chez les oiseaux sont les suivants :

- La veine jugulaire droite (elle est souvent plus développée que la gauche chez les oiseaux) est le lieu de ponction le plus fréquent. Située sur toute la longueur du cou, elle est très accessible car la plupart des espèces possèdent des aptériums cervicaux permettant une visualisation facile de la veine, à travers la peau, par transparence

comme sur la figure 15. Ces derniers sont absents chez quelques espèces, notamment les colombidés, les anatidés ou encore les ratites.

- La veine ulnaire (ou basilare) située sur la face interne de l'aile, à proximité de l'ulna (cf figure 16) est plus fine que la jugulaire et est plus sujette à la formation d'hématome.
- La veine médiale métatarsienne est située sur la face médiale du tarso-métatarse. Elle est plus facilement ponctionnable chez les oiseaux de grande taille comme les galliformes, les ansériformes ou les rapaces (cf figure 17).
- Le sinus occipital : souvent réservé aux euthanasies, il peut, ici, être utilisé comme lieu de ponction. Pour cela, il faut mettre l'articulation atlanto-occipitale en hyperflexion, le bec de l'oiseau doit presque toucher son cou. Puis, il faut palper dans cette région une zone plus souple et en légère dépression. C'est à cet endroit qu'il faut enfoncer l'aiguille avec un angle de 30-40° par rapport à l'axe des vertèbres jusqu'au sinus veineux (cf figure 18). Attention, le sinus est très peu profond et il est important de ne pas trop enfoncer l'aiguille pour éviter toute contamination (Touzet, 2007).



Figure 1516 : prélèvement sanguin à la veine jugulaire droite (Le Loc'h, image personnelle) :



Figure 17 : prélèvement sanguin à la veine basilare (Campbell, 2015) :



Figure 18 : veine médiale metatarsienne, lieu de prélèvement sanguin (Le Loc'h, image personnelle) :



Figure 18 : prélèvement sanguin au sinus occipital (Campbell, 2015) :

II.2.6.2.1.2 Les techniques de prises de sang chez les mammifères :

Chez les mammifères, le diamètre de l'aiguille à utiliser varie selon l'espèce. Une aiguille de 25 Gauge peut être sélectionnée chez des rongeurs alors qu'une de 21 Gauge sera plus adaptée chez un cervidé. Vu la diversité des espèces, les techniques de prélèvements sanguins sont à adapter selon les animaux rencontrés. Les lieux de ponction les plus fréquemment utilisés sont :

- La veine jugulaire qui est là aussi un lieu de ponction privilégié car facilement accessible (cf figure 19).
- La veine céphalique : située sur la face dorso-médiale du membre antérieur, elle est facilement accessible mais une tonte est souvent nécessaire pour bien la visualiser.
- La veine fémorale est souvent plus interne que les autres sites de ponctions présentés ici. Pour y accéder, il est nécessaire de disséquer la partie crâniale du membre postérieur sur sa partie interne tout en étant très précautionneux pour éviter de couper le vaisseau. **Afin d'obtenir plus de sang, chez l'homme, la veine peut être clampée à proximité du ligament inguinal et le membre légèrement surélevé (Dinis-Oliveira et al., 2010), cette technique semble applicable également chez l'animal.**
- Les veines saphènes externe et interne situées respectivement sur les faces latérale et médiale de la cuisse font parties des sites de ponction intéressants chez les rongeurs et les lagomorphes notamment (cf figure 20).



Figure 19 : prélèvement sanguin à la veine jugulaire (University of Alaska Fairbanks, 2019) :



Figure 20 : prélèvement sanguin à la veine saphène externe (Campbell, 2015) :

II.2.6.2.1.3 Les techniques de prises de sang chez les reptiles :

Les techniques sont différentes selon l'espèce prélevée, nous différencierons donc l'ordre des chéloniens, des sous-ordres des sauriens et des serpents.

Pour ce qui concerne les chéloniens, nous préconisons l'utilisation d'aiguille d'un diamètre de 25 Gauge, à adapter selon le format de l'animal. Les sites de ponction sont les suivants :

- La veine coccygienne dorsale : elle est située dans le tiers proximal de la queue en partie dorsale. Pour ponctionner, il faut tendre la queue et l'abaisser légèrement puis il faut insérer l'aiguille au tiers de la longueur totale de la queue dans sa partie dorsale avec un angle de 45°. Lorsque l'aiguille atteint les vertèbres coccygiennes, il est nécessaire de reculer légèrement tout en aspirant jusqu'à obtenir du sang (Touzet, 2007) comme nous pouvons le voir sur la figure 21.
- Le plexus veineux sous-nuchal est situé à la jonction entre le cou et l'écaille nucale. Pour réaliser une ponction, il est nécessaire de piquer avec un angle de 45° en direction de la carapace sous l'écaille nucale. Lorsque l'aiguille atteint les vertèbres, il faut reculer légèrement l'aiguille tout en continuant à aspirer jusqu'à obtenir du sang (cf figure 22).
- La veine jugulaire droite située en arrière de la membrane tympanique est très superficielle. Il faut tirer le cou de la tortue de façon à pouvoir visualiser le lieu de prélèvement. Ce dernier s'effectue au tiers ventral de la hauteur du cou avec une aiguille insérée de manière tangentielle à la peau. Le prélèvement peut aussi s'effectuer à la jugulaire gauche même si celle-ci est moins visible comme c'est le cas sur la figure 23.



Figure 21 : prélèvement sanguin à la veine coccygienne dorsale (Campbell, 2015) :



Figure 22 : prélèvement sanguin au plexus veineux sous-nuchal (Campbell, 2015) :



Figure 23 : prélèvement sanguin à la jugulaire gauche (Le Loc'h, image personnelle) :

Pour les sauriens, l'utilisation d'aiguille de 25 Gauge est également préconisée. Les sites de ponctions les plus fréquents sont :

- La veine coccygienne ventrale est située dans le tiers proximal de la queue mais ventralement contrairement à celle ponctionnée chez les chéloniens. Pour ponctionner, il faut placer l'animal en décubitus ventral au bord d'une table. Puis, il faut relever la queue et insérer l'aiguille médialement (pour éviter les héli-pénis chez les mâles) avec un angle variant de 45° à 90°. Lorsque l'aiguille atteint les vertèbres coccygiennes, il est nécessaire de reculer légèrement l'aiguille tout en continuant à aspirer jusqu'à obtenir du sang. C'est le site de ponction le plus fréquent chez les lézards (cf figure 24).
- La veine ventrale abdominale : c'est une veine située sur la ligne médiane de l'abdomen. Pour y avoir accès en *post-mortem*, le mieux est de pratiquer une incision latérale sur la peau du reptile, à l'aide d'un scalpel. Une fois ouvert, la veine est souvent bien visible au milieu de l'abdomen. Il est donc très important de ne pas inciser sur la ligne médiane afin de ne pas la toucher.



Figure 24 : prélèvement sanguin à la veine coccygienne ventrale (Campbell, 2015) :

Pour les serpents, le site de prélèvement principal est également la veine coccygienne ventrale. La technique est similaire à celle décrite chez les lézards. Toutefois, le lieu de ponction varie pour les mâles à cause de la présence d'hémi-pénis. Il est alors nécessaire d'insérer l'aiguille à mi-distance entre l'écaille pré-cloaquale et l'extrémité de la queue (Touzet, 2007).

II.2.6.2.2 L'extraction de sang du cœur en post-mortem :

Le cœur est la partie du corps où il y a le plus de sang et là où il coagule le moins. C'est donc un lieu de choix pour les prélèvements sanguins en *post-mortem*. Naturellement, plus le prélèvement est effectué rapidement après la mort de l'animal et plus il sera de qualité. Dans le cœur, il y a un mélange de plasma, de sang non coagulé et de sang coagulé. L'idée est de prélever les deux premiers (Munson, 2013).

Le prélèvement de sang cardiaque doit être effectué avant l'ouverture du cœur. Une fois le cœur individualisé, il faut ouvrir le sac péricardique et retirer le péricarde. Cela permet d'éviter la contamination avec un éventuel liquide péricardique. Puis, à l'aide d'une seringue surmontée d'une aiguille de 21 à 23 Gauge (à adapter selon la taille du cœur de l'animal), il faut rentrer dans une des cavités du cœur et aspirer. Nous conseillons de prélever dans le ventricule droit pour avoir un sang le moins contaminé possible (Dinis-Oliveira et al., 2010).

Il est important d'indiquer le lieu de ponction ainsi qu'une potentielle contamination lors de la prise de sang sur l'étiquette de l'échantillon.

11.2.6.2.3 L'extraction de sang du sinus cérébelleux :

L'extraction de sang du sinus cérébelleux est une technique développée par des vétérinaires espagnols (Arenas-Montes et al., 2013) et aujourd'hui utilisée par les agents du réseau SAGIR (ONCFS, Rossi, 2019). Elle permet d'obtenir du sang sur des mammifères de moyenne à grande taille (du renard au cerf) jusqu'à 48 heures après la mort de l'animal. L'intérêt de ce prélèvement réside aussi dans le fait que le sang est très peu dilué et contaminé. En outre, prélever à cet endroit permet d'obtenir une grande quantité de sérum peu hémolysé.

Pour la réalisation du prélèvement, nous conseillons l'utilisation d'une seringue de 10 mL accompagnée d'une aiguille de 80x0,2 mm (disponible en centrale d'achat). Comme tout prélèvement, il doit être le plus stérile possible, donc l'usage de gants est impératif.

Le prélèvement peut être réalisé même si seule la tête est disponible, ce qui peut représenter un intérêt si le cadavre est difficile à déplacer. Attention ce prélèvement se fait sur un individu non congelé. Pour la ponction, l'aiguille doit être enfoncée au niveau du canthus interne de l'œil caudalement avec un angle de 45° (cf figure 25). Il faut ensuite longer la paroi de la cavité orbitaire jusqu'à atteindre le nerf optique puis aspirer. Il faut faire attention à ne pas enfoncer l'aiguille trop profondément pour éviter toute contamination avec de la matière cérébrale, surtout sur les animaux de moins de 10 kg. Il est important de prélever dans les sinus cérébelleux droit et gauche avec le même matériel. En effet, quelquefois, la présence d'un caillot sanguin empêche le prélèvement sur un des côtés.

L'absence de sérum est possible sur les animaux morts depuis plus de 24 heures.



Figure 25 : prélèvement sanguin au niveau du sinus veineux sur une tête de sanglier, les flèches indiquent la position des sinus sur la coupe transversale de crâne (Arenas-Montes et al., 2013) :

II.2.6.3 Conservation et transfert des prélèvements sanguins :

Une fois le prélèvement effectué, il est essentiel de verser le contenu de la seringue dans un **ou plusieurs tubes selon le devenir souhaité de l'échantillon**. Avant de transvaser le contenu **de la seringue dans ces tubes, l'aiguille doit impérativement être retirée** pour éviter toute hémolyse.

Le tube choisi ainsi que le moyen de conservation de ce dernier dépendent du devenir de l'échantillon :

- **Sérum : il s'obtient** après avoir placé du sang dans un tube sec (tube à bouchon rouge). Ce dernier est laissé verticalement, à température ambiante, pendant une à deux heures pour permettre au caillot de se former. Ensuite le tube est placé dans la même position à 4°C pendant 12 heures. **L'OIE conseille de centrifuger le tube à 1000 à 3000 g pendant 10 à 15 minutes. En l'absence de centrifugeuse, cette étape peut être omise. Le sérum est alors extrait à l'aide d'une pipette stérile en évitant toute contamination avec le reste du tube. Le sérum est ensuite placé dans un nouveau tube qu'il est possible de congeler à -20°C (voire -80°C) ou d'envoyer directement à +4°C (OIE - World Organisation for Animal Health, 2008).**
- **Plasma :** pour le récupérer, le sang doit être placé dans un tube contenant un anticoagulant (**héparine, EDTA...**), homogénéisé puis centrifugé comme pour **l'obtention d'un sérum**. Le plasma peut ensuite être analysé directement ou envoyé sous 3 jours pour analyse (transport à +4°C). Sinon, il est possible de le conserver à -20°C **pour une durée d'environ un an, voire à -80°C pour une conservation à plus long terme (Hess, 2010).**
- **Sang total :** le contenu de la seringue doit être verser dans un tube contenant un anticoagulant (**héparine, EDTA...**). **L'héparine est utilisée pour les analyses biochimiques alors que l'EDTA est à privilégier pour l'hématologie. Attention tout de même, l'usage de l'héparine est formellement proscrit chez les amphibiens car elle entraîne une lyse des hématies (Campbell, 2015). Chez les oiseaux et les reptiles, l'EDTA reste l'anticoagulant de choix, même si certains cas d'hémolyses sont décrits chez certaines espèces (tortues, corvidés...)** (Campbell, 2015). Le sang total doit être conservé à +4°C et envoyé le plus rapidement possible (idéalement sous trois jours) **au laboratoire d'analyse**. Il est très fortement déconseillé de congeler le sang total pour ensuite l'analyser.

Une à deux gouttes d'un prélèvement sanguin peuvent également être déposées sur un papier buvard comme les cartes FTA® . La technique est décrite dans la partie II.2.1.3.2. Une fois séché, le papier buvard peut être conservé à température ambiante dans une pochette isotherme fermée **et vide d'air** (Aviagen, 2015). Si toute humidité est évitée, le papier peut toujours être utilisé des années après le prélèvement. Cette méthode permet de conserver les acides nucléiques contenus dans le sang mais serait également utile pour la réalisation de sérologie comme le montre plusieurs études en faune sauvage (Curry et al., 2014).

II.2.7. Les autres prélèvements :

Nous avons regroupé ici les différents prélèvements dont nous n'avons pas ou peu parlé dans les parties précédentes, et qui conservent un intérêt pour la réalisation d'analyses *post-mortem* en faune sauvage.

II.2.7.1 La sérologie sur « jus de poumon » :

Cette technique a été développée par le Dr Gauthier dans le cadre de la surveillance de la brucellose chez les ongulés de montagnes. Elle pourrait être **étendue à d'autres espèces** vu les bons résultats obtenus (Gauthier, 2019 : Communication personnelle).

Le poumon est intéressant car c'est un des tissus qui se dégrade le moins en *post-mortem*. Par ailleurs, il possède une quantité d'anticorps suffisante pour qu'ils soient détectés par analyses sérologiques après prélèvement.

Le prélèvement s'effectue sur un animal mort il y a moins de sept jours, ou dont le corps a été congelé dans cet intervalle. Après la résection du bloc cœur-poumon, il faut :

- Découper le plus stérilement possible (cf. technique expliquée dans la partie II.2.1.1.4) **un cube de tissu pulmonaire d'environ 2,5 g** dans une zone la moins souillée possible par le sang. Par exemple, nous conseillons souvent de prélever la partie dorsale du lobe diaphragmatique chez les cervidés.
- Placer cet échantillon dans une solution de 2 mL de PBS qui sert à rincer les cellules **de toutes traces du milieu extérieur. Il faut laisser l'échantillon immergé** pendant trente minutes à température ambiante.
- Agiter ensuite la solution au vortex pendant cinq minutes.
- Centrifuger la solution pendant quinze minutes à 3000 tours par minutes.
- **Recueillir le surnageant à l'aide d'une pipette stérile**

A la fin de cette procédure, nous obtenons un surnageant que nous pouvons utiliser pour les examens complémentaires de la même manière que le sérum obtenu après un prélèvement

sanguin. Nous pouvons donc le stocker à -20°C ou l'envoyer directement à $+4^{\circ}\text{C}$ au laboratoire d'analyses.

II.2.7.2 Le prélèvement de dents :

Les dents font partie des structures les mieux conservées en *post-mortem*. Elles contiennent notamment de l'ADN qui peut être utile pour identifier un individu dont il ne reste que quelques parties du squelette ainsi que les dents. Un intérêt est également évoqué en toxicologie *post-mortem* chez l'homme (Dinis-Oliveira et al., 2010) où les dents pourraient servir à la détection de morphiniques et autres xénobiotiques. Ces données pourraient donc être extrapolables aux animaux.

Lors du prélèvement des dents (ou crochets), il est important de porter des gants et il convient de faire très attention avec les animaux venimeux comme les serpents dont le venin n'est pas inactivé après la mort et chez qui le réflexe de morsure peut persister quelques minutes post décès.

Le prélèvement de dents ne présente pas de particularités ou une quelconque difficulté. Si le corps est encore bien conservé, une curette permettra de sectionner le ligament parodontal à la base de la dent et un davier sera très utile pour retirer les dents sans les abîmer. Une fois prélevées, les dents seront disposées dans un pot à prélèvement à garder à température ambiante ou au congélateur (Vikas, 2015).

II.2.7.3 Le prélèvement des os :

Il n'y a pas de région de prédilection pour prélever un os. Cependant, il paraît plus simple de travailler avec un os large comme le fémur ou l'humérus plutôt qu'avec le carpe.

Le prélèvement doit toujours être effectué avec des gants afin de se prémunir d'une possible zoonose. Lors de la découpe de l'os, des gants de protection peuvent être utilisés. S'il faut échantillonner plusieurs os, le matériel qui sert à la coupe doit être stérilisé entre chaque os.

Pour prélever un os, il faut dans un premier temps l'extraire du corps de l'animal. L'idéal est de conserver l'os en entier, donc il faut couper le tissu au niveau des articulations. Puis une fois l'os extrait, il est nécessaire de l'essuyer avec un tissu propre et sec afin d'éliminer les impuretés externes. Par la suite il faut découper des petites rondelles d'os pour faciliter la conservation. Pour cela, il faut utiliser une scie à os ou une scie-fil préalablement stérilisée. Néanmoins, cette étape peut être effectuée plus tard dans le processus si le prélèvement se fait sur le terrain. Dans ce cas, pour une conservation optimale, l'os doit être emballé dans du

papier absorbant ou un tissu et gardé à température ambiante jusqu'au laboratoire (Gaur et al., 2017).

Afin de bien conserver les rondelles osseuses obtenues précédemment, nous conseillons de les disposer dans des boîtes de Petri ou des sachets isothermes. Ces prélèvements seront ensuite stockés à +4°C jusqu'à utilisation.

La même technique de prélèvement et de conservation est applicable pour l'ivoire ou les cornes mais nous ne trouvons pas beaucoup ces parties anatomiques sur les animaux de nos régions.

III TROISIEME PARTIE : REALISATION DES PRELEVEMENTS *POST-MORTEM* SUR LA FAUNE SAUVAGE EN PRATIQUE :

Nous avons passé en revue les différents prélèvements que nous pouvons réaliser que ce soit dans des conditions idéales ou dégradées ainsi que les différentes conditions de conservation de ces échantillonnages. Intéressons-nous maintenant à la réalisation pratique de ces prélèvements sur le terrain ainsi qu'à l'ordre de leur réalisation.

III.1. GUIDES DES PREPARATIFS POUR EFFECTUER DE BONS PRELEVEMENTS SUR LE TERRAIN :

Ici, par le terme prélèvement nous entendons à la fois les prélèvements individuels évoqués lors de la partie II, mais également le prélèvement de corps sur le terrain. Nous englobons ainsi les prélèvements *post-mortem* sur le terrain et en laboratoire.

Il est essentiel d'avoir une bonne organisation préalable au déplacement sur le terrain. Cela permet d'effectuer les meilleurs prélèvements possibles dans les meilleures conditions en limitant l'exposition à de potentielles zoonoses.

III.1.1. Préparation du matériel à emmener sur le terrain pour réaliser des bons prélèvements *post-mortem* :

Avant d'effectuer une sortie sur le terrain, il convient de préparer le matériel nécessaire pour réaliser des échantillonnages sur place. Dans la majeure partie des cas, le prélèvement ne se fera pas sur le terrain mais nous considérons qu'il ne faut jamais négliger cette éventualité. Par ailleurs, certains corps peuvent être difficiles d'accès, par exemple en haute montagne, limitant la quantité d'équipements que nous pouvons emmener. Ainsi, nous distinguerons deux catégories, l'équipement minimum pour chaque sortie et une autre catégorie d'équipements dits facultatifs mais dont l'apport est non négligeable. Assurément, les listes que nous décrivons par la suite sont non exhaustives et permettent simplement d'avoir une idée du matériel à emporter lors de prélèvement sur le terrain (Friend, United States Geological Survey, 1999 ; Woodford et al., 2000 ; Munson, 2013 ; Terio et al., 2018).

III.1.1.1 L'équipement « minimal » pour effectuer des prélèvements *post-mortem* sur le terrain :

Nous distinguerons plusieurs catégories d'équipements :

- L'équipement de protection individuelle :
 - Gants en vinyles ou latex
 - Bottes ou surchaussures
 - Masque de protection
 - Tenue jetable ou lavable
 - Gel hydroalcoolique

- L'équipement lié au relevé de données :
 - Crayon à papier
 - Marqueur indélébile
 - **Fiche d'autopsie**
 - **Instrument de mesure (mètre, règle...)**
 - Un système de localisation de type *Global Positioning System* (GPS) (pour situer précisément le lieu de prélèvement)
 - Téléphone portable ou appareil photo (chargé, avec une carte mémoire vide)
 - Etiquettes
 - Liste des prélèvements à réaliser
- **Le matériel d'autopsie :**
 - Scalpel / lames de bistouri
 - Pincés
 - Couteau
 - Ciseaux
 - Cisailles
 - Matériel de nettoyage et désinfection (alcool, chlorhexidine...)
- Le matériel pour conserver les prélèvements :
 - Pots à prélèvement vide
 - Post avec **du formol à 4% (de différente taille, s'assurer de leur solidité)**
 - Récipients rigides
 - Sachets isothermes
 - Papiers buvards
 - Glacière et/ou poches de gel
 - Ethanol à 70°
 - Aiguilles et seringues (de différentes tailles si possible)
 - Ecouvillons stériles
 - Tubes sec et tubes EDTA

III.1.1.2 Equipement « secondaire » lors de prélèvement sur le terrain :

Ce matériel n'est pas indispensable sur le terrain mais permet de faciliter les prélèvements :

- Lunettes de protection
- Gel de silice
- Tablier de protection (jetable)
- Scie à métaux
- Hache / hachette
- Fil de suture
- Porte aiguille
- Ethanol à 96°
- Solution de DMSO
- Lame de verre

Il existe également des équipements volumineux **qu'il est difficile d'emmener sur** le terrain mais qui restent intéressants pour les analyses rapides de terrain ou pour la conservation des prélèvements :

- Microscope à miroir ou branchable sur une voiture
- Centrifugeuse portable
- Refractomètre
- Glacière électrique

III.1.2. Répartition des tâches lors de la réalisation de prélèvements *post-mortem* :

Avant de se rendre sur le terrain, il est essentiel de se répartir les différentes tâches à effectuer lors des prélèvements nécropsiques.

III.1.2.1 Une répartition des tâches entre personnes « propres » et « habillées » :

Nous séparons donc des tâches propres et d'autres dites « habillées » où l'exécutant est en tenue d'autopsie. Il est très intéressant d'avoir au moins une personne de l'équipe qui ne participe pas directement à l'autopsie, cela permet d'éviter la contamination des prélèvements et participe à un bon étiquetage et emballage de ces derniers.

Par ailleurs, pour chaque cadavre nous conseillons d'avoir un prospecteur principal. Dans l'idéal ce rôle doit advenir à une personne qualifiée, même si la situation se complique lors d'épidémie, de mortalité massive ou de cadavre de grande taille (Terio et al., 2018). Lors de cette dernière situation, il est essentiel d'adapter le nombre de personnes habillées à la taille du cadavre. Enfin, il est essentiel qu'un individu, qu'il s'agisse du prospecteur principal ou d'un autre, gère la communication au sein de l'équipe et entre celle-ci et les médias s'ils sont présents.

Les tâches à réaliser « habillé » sont donc les suivantes :

- Autopsie du cadavre, sous l'ordre d'un prospecteur principal si le cadavre est de taille importante.
- Prélèvement des différents échantillons nécessaires au diagnostic ou aux recherches (cf partie II).
- Collecte des données morphométriques (cf partie III.2.2).
- Nettoyage et désinfection de la zone d'autopsie (cf partie III.5).

Au contraire, les tâches à réaliser « propre » sont les suivantes :

- Etiqueter et gérer les échantillons prélevés par les personnes habillés.
- Prise de notes (exemple : remplir la fiche SAGIR au moment de la découverte du corps sur le terrain cf Annexe 1).
- Photo documentation avant et pendant l'autopsie (cf partie III.1.2.2).
- Recueil des commémoratifs : coordonnées GPS, conditions météorologiques, observation de l'environnement immédiat du cadavre (par exemple, s'il y a une accumulation de fèces autour de l'animal, cela veut sans doute dire qu'il n'était plus en état de bouger depuis quelques heures (Woodford et al., 2000). Il est également important de noter les signes de lutttes ou les éventuelles interventions de charognards).

III.1.2.2 Un rôle particulier : la réalisation de photographies :

La photographie a de nombreux avantages et est essentielle en autopsie, notamment sur le terrain (Laboratoire Départemental Vétérinaire et d'Hygiène Alimentaire des Hautes Alpes, 2019). En effet, la photographie :

- Permet de garder une trace d'une opération qui ne peut se dérouler qu'une seule fois, il n'y a pas de retour en arrière possible.
- Constitue une preuve en cas de litige ou lors de scène de crime, par exemple.
- Est très utile pour illustrer des cas.
- Permet de constituer une bibliothèque illustrative, utile pour la résolution d'autres cas.

Avant de se rendre sur le terrain, il est essentiel d'avoir une ou plusieurs batteries chargées ainsi qu'une carte mémoire avec suffisamment de place pour accueillir de nouvelles photographies. La définition des clichés doit être de l'ordre de 5 mégapixels (ONCFS, ADILVA, 2019). Si cela n'est pas possible, une résolution de 2 à 3 mégapixels, soit celle d'un téléphone portable de moyenne gamme, est un bon compromis. Aujourd'hui, les téléphones portables ont des appareils photos avec des capteurs de plus en plus puissants qui permettent une bonne définition photographique. L'idéal est l'usage d'appareil ou d'objectifs adaptés à la macrophotographie, car ce matériel est celui qui fournit le plus de détails par cliché.

Pour les scènes de crimes ou toute photographie vouée à être utilisée devant la justice, les modifications en post production sont à éviter sous peine de photographies inutilisables (Viner, 2015). Ainsi, il est important de réaliser des photographies bien exposées et détaillées sans modifications ultérieures

Sur le terrain, la première photo doit correspondre au document d'autopsie de l'animal en prenant soin d'inclure l'identifiant de l'animal (ce peut être par exemple la fiche SAGIR). Ensuite, il est conseillé d'effectuer un plan large du corps. Il est intéressant de photographier les quelques mètres qui mènent au cadavre ainsi que l'environnement immédiat de ce dernier. Nous conseillons d'utiliser une seule orientation et de la conserver pour toutes les photographies. Pour ce qui est de l'autopsie elle-même, quelques règles sont à respecter :

- Photographier chaque lésion au moins deux fois, d'abord en plan large pour la situer par rapport aux autres organes, puis en plan rapproché pour avoir des détails.
- Toujours avoir une échelle à l'aide d'un repère, l'idéal étant une règle ou une équerre graduée.
- Essayer de photographier de manière perpendiculaire au plan afin d'éviter toute déformation.

Pour l'archivage, nous suggérons de créer un dossier informatique pour chaque autopsie. Le nom du dossier doit contenir le nom de l'espèce ainsi que le numéro d'autopsie de l'animal et la date de prise de vue. Il peut être intéressant d'y rajouter le lieu de découverte ainsi que le diagnostic si établi. Les photographies originales doivent toutes être conservées dans ce dossier afin de pouvoir y revenir si nécessaire.

III.1.3. Rappel des règles de sécurité et de conduite à tenir lors de prélèvements *post-mortem* :

Lorsque nous travaillons avec des animaux morts, nous sommes forcément exposés à certains agents pathogènes pour l'homme mais également pour d'autres animaux. Il est donc important de limiter cette exposition. Les zoonoses peuvent être d'origine bactérienne, virale, fongiques, parasitaires ou dues à des prions. Certaines de ces maladies sont des maladies à déclaration obligatoire, d'autres sont considérées comme des maladies professionnelles réglementées par le code de la sécurité sociale. Les principales zoonoses qui sont importantes en faune sauvage, sont listées dans l'Annexe 3. Il est également nécessaire de rappeler aux personnes immunodéprimées d'éviter d'autopsier des animaux sauvages. Pour finir, les vaccinations antirabiques, BCG et diphtérie-tétanos-poliomyélite sont très fortement conseillées pour les intervenants (SAGIR et al., 2011 ; Terio et al., 2018).

Afin d'éviter de contracter une zoonose ou de disséminer tout autre maladie contagieuse quelques règles de sécurité sont à appliquer sur le terrain mais aussi lors des autopsies en laboratoire. La première grande catégorie de règles concerne la collecte de cadavre sur le terrain avant autopsie en laboratoire. Voici certains conseils pour minimiser les risques lors de cette étape (SAGIR et al., 2011) :

- Porter des gants lors de la collecte du corps.
- **Prélever le corps à l'aide d'un sac plastique étanche en le retournant pour éviter de contaminer l'extérieur du sac via un éventuel contact avec l'animal.**
- Refermer le sac de façon à former un col de cygne, il est important de tenir le sac à **bout de bras afin d'éviter toute inhalation de** particule contaminée lors de la fermeture du sac.
- **Ne pas hésiter à pulvériser de l'eau de javel** (ou tout produit désinfectant) sur tout sac lors de suspicion de contamination externe.
- Déposer le premier sac dans un deuxième sac étanche (un sac poubelle peut suffire) et appliquer la technique préalablement décrite pour fermer ce second sac.

Ensuite des principes simples sont à appliquer pour se protéger lors d'une autopsie. Il est impératif de porter au moins une paire de gants en latex ou en vinyle à usage **unique**. **L'idéal est de renforcer cette protection à l'aide de gants** de fouilles portés sous la première paire. **Le port d'une tenue** intégrale de protection jetable ou lavable est également indispensable. Le reste de la tenue est complétée par un masque de protection (si possible avec des filtres pour une meilleur protection) qui est très important lors des risques de zoonoses à tropisme respiratoire. Dans certains cas particuliers, un équipement de protection supplémentaire peut **être adapté**. Ainsi, lors d'autopsie sur des animaux venimeux, une protection oculaire de type lunettes **n'est pas négligeable pour se prémunir d'éventuelle projection de substance toxique** (Terio et al., 2018). Pour finir, avant l'ouverture d'un oiseau nous conseillons de mouiller les plumes avec une solution aqueuse ou alcoolique afin d'éviter la dissémination de plumes ou de particules situées sur la peau.

Par ailleurs, pendant et après l'autopsie, des mesures d'hygiènes sont à respecter (SAGIR et al., 2011) :

- **Se laver les mains avant d'effectuer toute action après un contact avec un cadavre ou tout autre agent contaminant.** Le lavage doit prendre au moins une minute, le temps que **l'action mécanique fasse effet**. En complément, la désinfection avec un gel hydroalcoolique est également recommandée.
- **Ne pas mettre d'objet** (un stylo par exemple) **dans la bouche pendant l'autopsie.**
- Eviter de toucher son **visage pendant l'autopsie.**

- Nettoyer ses bottes et toute tenue lavable (comme un tablier) à l'eau puis les désinfecter avec de l'eau de javel ou un autre agent désinfectant une fois l'autopsie terminée (Cf partie III.5.3).
- En cas de lésions (morsure, coupure ou autre) pendant l'autopsie, laver immédiatement la blessure avec de l'eau propre et du savon. Appliquer un désinfectant si possible. Si la blessure n'est pas trop importante et si l'autopsie n'est pas terminée, il faut changer de paires de gants avant de reprendre le travail.
- Vérifier l'absence de tiques ou de tout autre parasite sur son corps après une autopsie.
- En cas de signes cliniques ou de suspicion de zoonose, contacter immédiatement un médecin en lui précisant les dangers rencontrés.

Enfin, il y a également des procédures simples à respecter lors de l'étape de préservation et de transport des prélèvements. Si une glacière est utilisée pour le transport de corps ou d'échantillons, elle ne doit servir qu'à cette unique fonction. Il serait dangereux de mettre dans ce même contenant de la nourriture ou des boissons. Une fois arrivé au laboratoire, il est important de nettoyer l'intérieur et l'extérieur de la glacière puis de désinfecter ces deux compartiments avec un agent désinfectant comme l'eau de javel à 10%. Par ailleurs, lors de l'envoi de prélèvements, le triple emballage est fortement conseillé (cf partie III.4) afin d'éviter toute fuite et ou contamination externe lors du transport et à l'ouverture du colis.

III.2. EVALUATION DE L'ETAT D'UN CADAVRE SUR LE TERRAIN :

Une fois arrivé sur le terrain, la première chose à faire est d'évaluer l'état de fraîcheur (ou de décomposition) du cadavre que nous souhaitons autopsier. En effet, comme expliqué dans la partie II.1.2, selon l'état d'un corps, nous pouvons décider de l'autopsier en laboratoire ou sur le terrain. Naturellement, ce n'est pas le seul paramètre qui rentre en jeu puisque les paramètres logistiques ainsi que les possibilités d'accès au corps sont à prendre en compte.

III.2.1. Evaluation de l'état de conservation d'un cadavre :

III.2.1.1 Mécanismes intervenant dans la décomposition d'un cadavre et facteurs favorisants :

Après la mort d'un animal, plusieurs phénomènes interviennent et le corps se dégrade. Parmi ces phénomènes, citons-en deux des plus importants : la dessiccation et la décomposition.

La dessiccation est l'ensemble des mécanismes qui entraîne un assèchement du corps, particulièrement au niveau des surfaces humides lors du vivant de l'animal comme les muqueuses.

La décomposition est le phénomène le plus fréquent et celui qui entraîne le plus de changements *post-mortem* sur un cadavre. Le mécanisme démarre immédiatement après la **mort de l'animal**, au niveau cellulaire. La perte de dioxygène et de glucose, précurseurs nécessaires à la production d'adénosine triphosphate (ATP), **ainsi que l'accumulation de dioxyde de carbone et d'autres déchets** entraînent une rupture des membranes cellulaires et des lysosomes partout dans le corps et. La destruction de ces derniers libère de nombreuses **enzymes lysosomales qui dégradent rapidement le reste des tissus, c'est ce que nous appelons l'autolyse** (McDonough, Southard, 2017). Les lysosomes sont présents dans tout le corps mais particulièrement au niveau de l'estomac et du pancréas qui sont donc autolysés rapidement. Le foie, les reins et le cœur sont autolysés par la suite, alors que les tissus fibreux, moins riches en lysosomes sont autolysés tardivement. Il en résulte un ensemble de débris cellulaires ainsi que de cytoplasme très propices à **la prolifération bactérienne. C'est un deuxième mécanisme de la décomposition nommé putréfaction** (Brooks, 2016). Cette dernière est à l'origine de **plusieurs artefacts** notamment une coloration noirâtre de certains tissus résultant d'une réaction entre l'hémoglobine des hématies et le sulfate d'hydrogène produit par les bactéries. Celles-ci sont également à l'origine de **l'accumulation de gaz** dans certains organes, comme le tube digestif, **phénomène qui peut aller jusqu'à la rupture organique** (McDonough, Southard, 2017). La putréfaction commence dans un premier temps dans les organes **digestifs puis s'étend au reste des tissus en finissant par les os.**

Par ailleurs, la décomposition d'un corps est fortement influencée par les conditions météorologiques ainsi que par l'environnement immédiat du cadavre. En effet, il a été démontré que **les cadavres se décomposent plus vite s'ils sont exposés** directement à des fortes températures et / ou à un **haut degré d'humidité. Par ailleurs, l'intervention d'animaux charognards et d'insectes nécrophages accélère la décomposition** ainsi que la dégradation du cadavre. Les corps enterrés ou semi enterrés sont moins exposés aux prédateurs, charognards, insectes et sont donc mieux préservés (Brooks, 2016). **Il peut donc s'avérer utile de consulter les données météorologiques des derniers jours sur la zone de prélèvement afin d'avoir une datation plus précise du moment de la mort de l'animal.**

Dans tous les cas, si au cours de l'autopsie, nous jugeons qu'une lésion anormale pourrait être due à l'autolyse ou à la putréfaction, il vaut mieux prélever afin de s'en assurer (Munson, 2013).

Les cadavres de reptiles et d'amphibiens sont particulièrement sensibles aux mécanismes de dégradation.

III.2.1.2 Evaluer l'état de décomposition d'un cadavre en pratique :

Pour contextualiser une autopsie et pour pouvoir établir le diagnostic le plus précis possible, il est important d'évaluer l'état de décomposition d'un cadavre. Terio *et al.*, se fondent sur une classification utilisée chez les mammifères marins, pour dresser cinq catégories de décomposition (Terio et al., 2018). Elles sont regroupées dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Evaluation de l'état de décomposition d'un cadavre sur le terrain (Terio et al., 2018) :

Stade de décomposition du cadavre	Description de l'état du cadavre
Stade 1	Animal vivant
Stade 2	Cadavre frais / Décomposition légère : le corps est intact; la peau est sèche mais ferme; absence d'organe protubérant; les yeux sont clair; absence de distension abdominale ou de dilatation gastrique du tube digestif.
Stade 3	Décomposition modérée : le corps est toujours intact; la peau est sèche mais les poils ou les plumes s'enlèvent très facilement; l'abdomen est distendu et il y a une dilatation gastrique ; les organes changent de couleur mais restent reconnaissables.
Stade 4	Décomposition avancée : Certains organes du tube digestif sont fortement décolorés et très friables voire liquéfiés
Stade 5	Cadavre momifié / squelette : très souvent il ne reste que quelques lambeaux de peau séchée, un peu de muscles et des os

Les corps qui appartiennent à la deuxième catégorie sont ceux qui sont considérés comme idéaux pour réaliser les prélèvements. Ceux des troisièmes et quatrièmes catégories sont encore très intéressants pour échantillonner mais quelques précautions d'interprétation sont de mise. Enfin, la cinquième catégorie correspond aux corps momifiés ou à l'état de squelette. La momification est un phénomène qui arrive par temps sec ou venteux avec peu d'humidité. La peau prend une couleur jaunâtre à marron avec une consistance de parchemin. La dessiccation extrême que subit le corps entraîne également une contraction importante de certains muscles ainsi que des extrémités. Le temps nécessaire à une momification n'est pas bien connu mais cela prendrait au moins quelques semaines (Brooks, 2016). Pour les corps appartenant à cette cinquième catégorie, les examens et prélèvements sont limités. Néanmoins, il ne faut pas négliger les prélèvements et analyses qui exploitent l'ADN (surtout celui de l'animal), lesquels peuvent se conserver pendant plusieurs mois. En revanche, l'ARN se conserve moins bien et est très souvent inexploitable. Par ailleurs, les examens toxicologiques peuvent donner quelques résultats.

III.2.2. Evaluation de l'état corporel de l'animal et premier examen externe :

Une fois l'état de décomposition évalué, nous pouvons effectuer quelques relevés importants avant de décider si l'autopsie se fera sur le terrain ou en laboratoire.

Dans un premier temps, il faut toujours essayer de connaître l'espèce de l'animal, son âge (juvénile ou adulte au moins) et son sexe si possible. La mesure des données morphométriques est également importante. Si une balance est disponible et si l'animal n'est pas trop gros, nous conseillons de peser le corps même si nous ne planifions pas de faire l'autopsie sur place. En effet, une fois congelé ou réfrigéré, le poids d'un animal peut grandement différer de ce qu'il était à l'origine.

Par la suite, nous pouvons évaluer l'apparence externe de la carcasse notamment l'aspect de la tête et des organes qui la compose (yeux, gueule ou bec, dents, oreilles...) ainsi que les phanères. En outre, toute lésion externe doit être notifiée tout comme des potentiels signes de consommation par des charognard (morsures, parties manquantes du cadavre...) ou tout autre traumatismes (fracture, déformation...).

Il faut aussi évaluer l'état corporel de l'individu. L'évaluation externe peut être faite en palpant (avec des gants) les parties musculaires de l'animal (Terio et al., 2018). Parmi celle-ci, nous citerons la musculature dorso-lombaire, les muscles des cuisses et de l'épaule chez la plupart des mammifères. Chez les oiseaux, la palpation du bréchet permet d'évaluer le score corporel. Chez les serpents, la musculature dorso-lombaire est à évaluer, ainsi que la partie ventrale qui est creusée en cas d'amaigrissement. De manière générale, l'état corporel d'un animal mort s'évalue donc comme chez un individu vivant. Cette évaluation devra ensuite être précisée lors de l'autopsie, avec l'observation de zones d'accumulation de tissus adipeux, lesquelles se situent préférentiellement dans l'abdomen (ou la cavité coelomique), et au niveau du cœur et des reins...

Pour finir, l'examen externe peut permettre de déterminer si une carcasse ne doit absolument pas être ouverte sous peine de s'exposer à des zoonoses dangereuses pour les intervenants. Le cas le plus documenté et le plus important est celui de l'anthrax ou maladie du charbon ou encore fièvre charbonneuse. Nous allons développer plus précisément cet exemple tout en rappelant que tout autre suspicion de maladies zoonotiques hautement contagieuse (comme l'influenza aviaire hautement pathogène) nécessite une autopsie en laboratoire sécurisé (laboratoire de catégorie 3 pour l'influenza aviaire hautement pathogène). La plupart de ces maladies ou agents infectieux sont listés dans la catégorie A UN2814 de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) visible dans l'Annexe 4 (OIE - World Organisation for Animal Health, 2008).

La fièvre charbonneuse est causée par la bactérie *Bacillus anthracis*. Elle touche principalement les herbivores comme les ruminants sauvages ou domestiques mais peut **s'étendre aussi aux autres mammifères**. Sur le terrain, la maladie du charbon est caractérisée par une mortalité brutale avec des animaux en opisthotonos. Les autres signes cliniques sont les suivants (Gavier-Widén et al., 2012) :

- Liquide séro-hémorragique sortant de la bouche, de l'anus ou des narines.
- **Œdème cérébral vasogénique.**
- Formation *post-mortem* de caillot sanguin dans les gros vaisseaux contenant les bacilles charbonneux, avec le reste du sang qui coagule mal.
- Pétéchies **sur l'ensemble du corps.**
- Gonflement marqué et rapide de la carcasse.
- **Œdème inflammatoire aigu des tissus mous de la tête, de la langue, de la gorge et de l'intestin chez les carnivores.**

S'il y a présence d'un ou plusieurs de ces signes, il est impératif d'effectuer un frottis sanguin sur prise de sang et de l'observer au microscope avant d'ouvrir la carcasse (cf partie II.2.1.4.2.4). Le sang doit être prélevé dans les zones périphériques comme les oreilles ou la partie distale de la queue chez les herbivores (car elles font parties des derniers lieux d'autolyse) et sur les zones de gonflement chez les carnivores (Terio et al., 2018). Les bacilles charbonneux apparaissent sous formes de gros bâtonnets rectangulaire (jusqu'à 10µm de long) encapsulés, isolés ou sous la forme de chaînes de bactéries (Munson, 2013). Si aucun microscope n'est disponible sur le terrain, et si la suspicion est forte, nous conseillons de détruire la carcasse (cf partie III.5.2). De la même manière, si nous identifions une population de *Bacillus anthracis* au microscope, comme sur la figure 26, nous conseillons également la destruction de la carcasse.

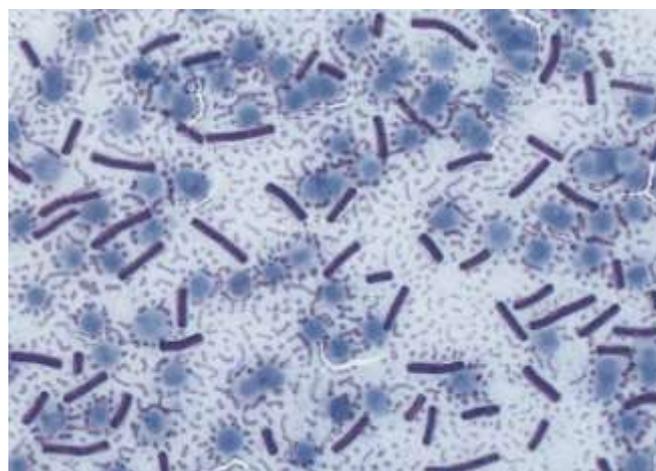


Figure 26 : Observation de *Bacillus anthracis* sur un frottis sanguin coloré au Giemsa (De Vos, Turnbull, 2004) :

III.2.3. Devenir du cadavre :

Comme nous l'avons évoqué précédemment, la décision concernant l'autopsie du cadavre ainsi que son lieu de réalisation dépend de plusieurs facteurs.

Premièrement, nous devons déterminer si l'autopsie est réalisable ou non. Dès que le risque sanitaire est trop grand pour les intervenants, typiquement dans le cas de la fièvre charbonneuse, nous conseillons de ne pas réaliser l'autopsie sur le terrain, voire pas du tout si l'intérêt de l'autopsie, et des prélèvements qui en résultent, n'est pas essentiel pour la recherche ou pour toute mesure sanitaire. Si l'autopsie est réalisée, elle devra l'être dans un laboratoire sécurisé et adapté pour le travail avec des agents infectieux. Le travail peut être fait en tenue sécurisée, sous atmosphère contrôlée ou tout simplement sous hotte selon les différents risques présentés par les agents infectieux suspectés.

Dans un second temps, si nous considérons que l'autopsie est réalisable, il nous faut choisir entre une autopsie au laboratoire, donc un transport du corps, et une autopsie sur le terrain. L'idéal étant la première solution puisque cela permet de travailler dans un environnement sécurisé avec un matériel plus important et potentiellement en équipe plus complète. Le stockage des différents prélèvements y est également plus simple ainsi que leur transfert vers d'autres laboratoires d'analyses. Cependant, dans certains cas l'autopsie sur le terrain est à privilégier :

- Le cadavre est trop gros pour être transporté.
- Le cadavre est situé dans un lieu difficile d'accès où transporter un cadavre serait plus dangereux que de l'autopsier sur place.
- Le cadavre est situé dans un lieu trop éloigné d'un laboratoire, et les moyens de conservations à disposition ne permettent pas de conserver un corps en bon état jusqu'au laboratoire (ou du moins, dans un état jugé optimal).
- Le cadavre est trop dégradé pour ne pas être abimé par le transport.

III.3. CHOIX DES DIFFERENTS PRELEVEMENTS POST-MORTEM :

Une fois, l'examen externe pratiqué et la décision du lieu de l'autopsie prise, intéressons-nous maintenant au choix et à l'ordre des prélèvements évoqués dans la partie II. En effet, savoir réaliser un bon prélèvement est important mais il faut souvent en réaliser plusieurs sur les mêmes organes tout en gardant un maximum d'informations pour les différents examens complémentaires nécessaires à la fois à la recherche et au diagnostic clinique.

Le choix et l'ordre des différents prélèvements dépendent fortement du contexte. Il faut différencier les cas où nous suspectons une maladie précise et ceux où nos hypothèses diagnostiques sont nombreuses.

III.3.1. Suspicion d'une maladie de première ou de deuxième catégorie :

Statistiquement la majorité des entités infectieuses suspectées sur le terrain sont des dangers sanitaires de première ou deuxième catégorie. La liste de ces dangers sanitaires est disponible dans les annexes I.a et II de l'arrêté du 29 juillet 2013 relatif à la définition des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les espèces animales (Legifrance, 2018).

Lors de **suspicion d'une de ces maladies**, il existe généralement des procédures de prélèvements précises définies par plusieurs organismes comme l'ONCFS (notamment le réseau SAGIR), l'Anses, la plateforme ESA (ESA, 2019).

Ainsi, pour toute suspicion de pestes porcines (africaine ou classique) sur un sanglier, l'ONCFS conseille le **prélèvement d'au moins 20 g** de rate, de la moelle osseuse ou à défaut un écouvillon de sang. Par comparaison, les prélèvements requis chez un oiseau avec une suspicion **d'infection par le virus du Nil occidental** sont un échantillon de foie, de rate ainsi que **l'encéphale dans son ensemble**.

III.3.2. Absence de suspicion précise :

Contrairement au cas de figure précédent, quelquefois, nous avons un diagnostic différentiel très large qui nécessite de nombreux prélèvements. Il existe même des autopsies où nous n'avons aucune suspicion clinique.

Dans ce cas, il est possible de prélever **un nombre d'échantillons important**. Nous avons dressé, sous la forme d'un organigramme (cf figure 27), les **prises d'essais** qui peuvent être réalisées ainsi que leur ordre de prélèvement. Nous indiquons également les conditions de conservation de ces échantillons, les explications sont sur la légende (cf figure 28).

Ici, nous nous plaçons dans le cas d'un cadavre dans un état de décomposition allant d'un stade 2 à 4 (cf partie III.2.1.2), sans lésion apparente et sans aucune suspicion clinique. Lors de la découverte d'un corps en stade 5 de décomposition, seuls les **prélèvements toxicologiques et d'acides nucléiques (ADN)** conservent un intérêt (Terio et al., 2018).



Figure 27 : indication des prélèvements à réaliser lors d'absence de suspicion clinique et diagnostique (Production personnelle) :

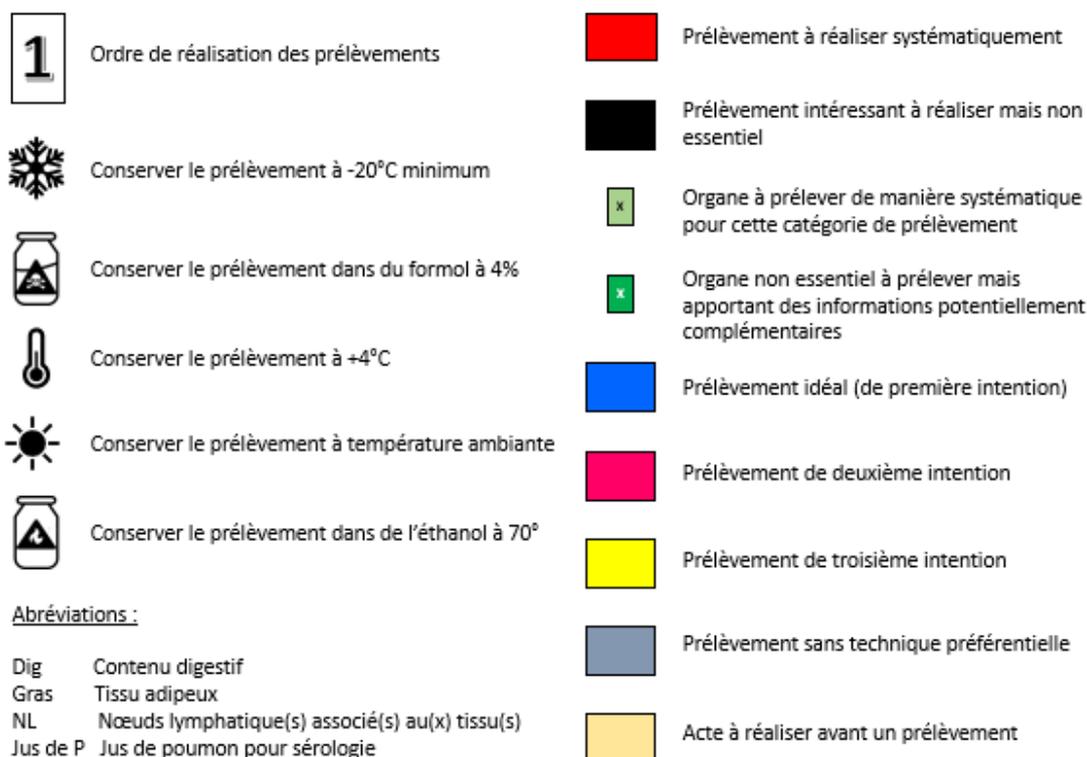


Figure 28 : élément de légende des différents diagrammes de la partie III.3 (Production personnelle) :

Les étapes 1 et 2 s'effectuent avant l'ouverture du corps. Une fois ce dernier ouvert, il faut se placer à l'échelle de l'organe. Ainsi, pour chaque organe, il y a des prélèvements à réaliser dans un ordre précis. Si nous prenons l'exemple du foie, il faut dans un premier temps effectuer deux prélèvements microbiologiques, un pour la virologie et un pour la bactériologie, puis un prélèvement toxicologique. Ensuite, il faut faire un prélèvement d'une partie de l'organe pour d'éventuelles analyses histologiques. Ces trois grandes catégories de prélèvements sont indispensables, ne serait-ce qu'à titre conservatoire, pour avoir le maximum d'information et pouvoir effectuer de nouveaux examens complémentaires si nécessaire.

Pour chacune de ces grandes catégories de prélèvements « obligatoires », à droite de la figure 27, nous avons listé les organes à prélever impérativement et ceux qui peuvent apporter des informations complémentaires en cas d'analyse. Par ailleurs, à l'extrême droite de la figure 27, se trouvent les différentes techniques de prélèvements pour chaque grande catégorie de prélèvement.

A cela, peuvent s'ajouter d'autres prélèvements qui sont facultatifs, mais qui apportent des informations supplémentaires, comme les prélèvements génétiques. En outre, d'autres prélèvements sont plutôt situationnels. C'est le cas des prélèvements sanguins sur un animal fraîchement décédé ou des prélèvements parasitologiques sur des organes parasités.

Enfin, dans la figure 27, nous n'abordons pas le tube digestif. Ce système fait l'objet d'un diagramme particulier abordé dans la figure 29.

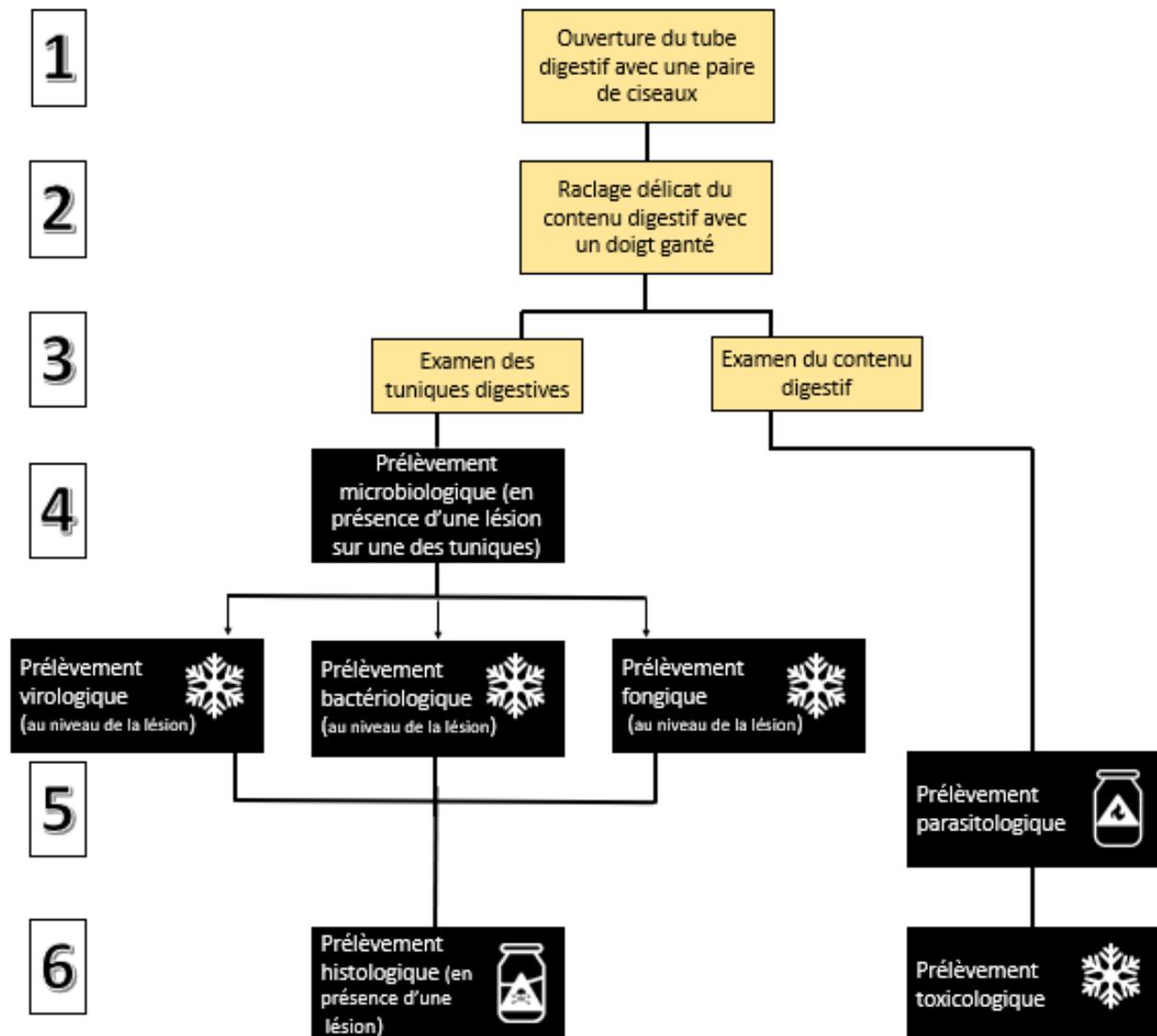


Figure 29 : ordre des prélèvements à réaliser sur le tube digestif des animaux sauvages (Production personnelle) :

Avant d'examiner les différents segments du tube digestif, nous conseillons de sortir ce dernier du cadavre. L'idéal est d'avoir tous les segments entiers et reliés (Terio et al., 2018 ; McDonough, Southard, 2017). Une fois cette étape effectuée, il faut procéder à leur ouverture délicatement grâce à des ciseaux. Si possible, il faut les ouvrir les uns après les autres pour ne pas mélanger leur contenu. Dans ce diagramme, nous séparons l'examen du contenu digestif de celui des différentes tuniques (muqueuse, sous muqueuse, musculuse et séreuse). En effet, les prélèvements sont différents entre ces deux entités. En cas de contenu anormal, il peut néanmoins être intéressant de le congeler pour d'éventuelles analyses microbiologiques.

III.4. TRANSFERT D'UN ENSEMBLE DE PRELEVEMENTS VERS UN OU DES LABORATOIRES D'ANALYSES :

Avoir des bons prélèvements, réalisés dans un ordre qui assure les meilleurs résultats possibles, est une étape importante dans le diagnostic *post-mortem* en faune sauvage. Néanmoins, si les échantillons sont mal transférés, n'arrivent pas à destination, ou en mauvais état, les procédures que nous avons décrites auparavant n'auront que peu d'utilité. Ainsi, la bonne réalisation du transfert des prélèvements est essentielle pour finaliser notre travail. Il y a cinq **grands enjeux dans l'envoi d'échantillons** (Friend, United States Geological Survey, 1999) :

- Éviter la contamination croisée entre les différents prélèvements.
- Éviter la décomposition ou la détérioration des prélèvements.
- Prévenir toute fuite de liquide.
- **Préserver l'identité de chaque prélèvement.**
- Correctement étiqueter chaque colis contenant un ou plusieurs prélèvements.

Les conseils donnés ici ne le sont qu'à titre indicatif, il est toujours conseillé de contacter le laboratoire auquel l'équipe souhaite envoyer des prélèvements afin d'avoir des informations plus complètes et spécifiques.

III.4.1. Comment bien étiqueter des prélèvements ?

Le bon étiquetage des prélèvements permet de ne pas perdre certaines données et d'adresser les bons prélèvements aux bons destinataires. L'étiquetage doit être effectué juste après l'obtention des échantillons, par une personne « propre » (cf partie III.1.2.1). Les informations minimales qui doivent figurées sur une étiquette (ou sur un prélèvement directement) sont les suivantes : date de l'échantillonnage, espèce de l'animal, nature du prélèvement (tissu, environnement...) et numéro d'identification de l'animal (peut correspondre au numéro SAGIR par exemple). Nous conseillons également de rajouter la destination du prélèvement et son mode de conservation futur.

Pour écrire sur les prélèvements ou les étiquettes, l'utilisation de marqueurs indélébiles résistants à l'alcool, aux solvants ainsi qu'aux températures négatives, jusqu'à -80°C dans l'idéal, est conseillée. Nous noterons toutefois une exception, le crayon à papier est bien plus indiqué pour écrire sur les lames en verres (Terio et al., 2018).

L'étiquetage peut même être doublé. En effet, il est intéressant de placer une seconde étiquette, contenant des informations similaires à la première, sur le contenant du prélèvement, c'est-à-dire sur une glacière, un sac isotherme... Par ailleurs, il faut reporter les informations relatives à chaque prélèvement sur un document (informatique ou papier) à conserver après l'autopsie.

Enfin, pour ce qui est des cadavres entiers, il est intéressant d'attacher une étiquette à la patte de l'animal. L'étiquetage peut également être doublé avec un papier similaire collé sur le sac contenant le cadavre. L'utilisation de matériel polysynthétique multirésistant aux solvants et aux liquides comme le Tyvek® est décrite (Terio et al., 2018), ceci afin d'avoir une meilleure conservation des données qui suivront le corps.

III.4.2. Transfert des prélèvements du terrain jusqu'à un laboratoire voisin :

Nous situons dans le contexte d'une autopsie de terrain. Une fois cette dernière pratiquée et les prélèvements réalisés, il est important de les conserver correctement jusqu'à l'arrivée au laboratoire le plus proche (ou tout autre lieu où les prélèvements seront reconditionnés). Naturellement, si l'équipe dispose du matériel nécessaire à la réalisation de triple emballage directement sur le terrain, nous conseillons de passer directement à cette étape (cf partie III.4.3).

Pour les échantillons qui doivent rester à +4°C, nous conseillons de les mettre dans une glacière contenant des blocs ou sac réfrigérants. Si l'équipe ne dispose pas de ces derniers, ils peuvent être remplacés par des bouteilles préalablement vidées puis remplies d'eau et congelées (Friend, United States Geological Survey, 1999). L'idéal est de placer les échantillons dans un sac isotherme afin qu'ils ne soient pas directement en contact avec ces matériels réfrigérants.

La conservation et le transport des échantillons qui doivent être congelés est presque impossible sans congélateur. Il est donc préférable de placer les prélèvements à +4°C également. Par ailleurs, afin d'éviter toute contamination croisée, il est important de vérifier l'étanchéité des flacons, sacs isothermes ou autres récipients contenant les prélèvements, avant le transport.

Pour les prélèvements destinés à l'histologie, il y a plusieurs solutions. Si l'équipe est équipée de pots à prélèvement avec du formol, l'idéal est de placer les échantillons dans ces pots, tout en respectant les conditions de sécurité évoquée dans la partie III.1.3. Jusqu'à l'arrivée au laboratoire, les échantillons peuvent être mis dans des volumes de formol moins conséquents (cf partie II.1). L'important est d'assurer un transport sécurisé des prélèvements,

en s'assurant que les pots sont bien fermés, et en les plaçant dans un contenant matelassé de façon à éviter toute casse. En revanche, si l'équipe ne possède pas de formol, les échantillons doivent être placés dans des pots à prélèvements stockés à +4°C. Ils doivent être amenés le plus vite possible au laboratoire afin d'être fixés.

Enfin, pour les papiers buvards, les poils, ou tout autre prélèvement ne nécessitant pas un stockage à une température de +4°C, les conseils donnés dans la partie II sont à appliquer.

III.4.3. Transfert de prélèvements vers d'autres laboratoires d'analyses :

Nous allons maintenant aborder le transfert de prélèvements vers un laboratoire éloigné. Dans la majorité des cas, nous conseillons d'envoyer dans les 24 heures les prélèvements réalisés afin d'éviter de devoir les envoyer congelés.

La grande majorité des prélèvements étant potentiellement infectieux, leur transfert doit respecter certaines normes définies par l'OMS. Les matières infectieuses sont classées en deux catégories. Nous parlons de la catégorie A dans la partie III.4.4 ; la liste des matières appartenant à la catégorie A se trouve dans l'Annexe 4. Celles qui font partie de la catégorie B sont toutes les substances infectieuses qui ne rentrent pas dans la catégorie A. La plupart des prélèvements en autopsie de faune sauvage font partie de cette catégorie dès lors qu'une maladie est suspectée. Les prélèvements appartenant à la catégorie B doivent être emballés dans des triples emballages respectant la norme UN3373 (autrement nommée ADR2013 ou P650) (World Health Organization, 2017), un exemple est visible sur la figure 30.

Les sites marchands ou magasins vendant ces triples emballages se trouvent facilement via une recherche internet. Il est aussi possible de contacter le laboratoire auquel sont destinés les échantillons car certains fournissent eux-mêmes des emballages homologués. Chaque emballage a un rôle bien précis. **Le premier est celui qui contient l'échantillon, il doit être étanche et bien fermé, il peut s'agir d'un pot de prélèvement, d'un sac isotherme, d'un tube...** Il doit être enveloppé de matière absorbante afin de prévenir toute fuite potentielle. **Le deuxième doit contenir le premier, il s'agit souvent d'un sachet étanche ou d'un récipient étanche.** Si le prélèvement contient du liquide, le deuxième emballage doit contenir une matière absorbante (gel de silice, tampon absorbant) pour pallier une éventuelle fuite. Un emballage secondaire peut contenir plusieurs emballages primaires, si ces derniers sont rembourrés. **Normalement, la fiche d'accompagnement du prélèvement doit être glissée dans une poche externe de cet emballage secondaire. L'emballage tertiaire doit être rigide, généralement, un carton. C'est sur ce dernier qu'il faut mettre l'adresse du laboratoire destinataire.** Les dimensions minimales de ce dernier emballage sont de 10 cm X 10 cm X 10

cm (World Health Organization, 2017). Attention, il ne faut pas mettre plus de 4 kg d'échantillons ou 4 L de liquide contenant des échantillons dans ces emballages.

Dans le cas de prélèvements à envoyer à une température de +4°C, la glace ou les pains de glace sont à placer à l'extérieur de l'emballage secondaire, dans un emballage qui leur est propre (World Health Organization, 2017).

Pour l'envoi de prélèvements congelés, nous conseillons de consulter le transporteur pour ne pas rompre la chaîne du froid et ainsi conserver une qualité optimale des échantillons. Les transporteurs utilisent souvent des containers refroidis saturés en vapeur d'azote. Une autre solution consiste à placer de la carboglace à l'extérieur de l'emballage secondaire dans un emballage externe afin de conserver une température négative. Dans ce cas, l'usage de carboglace doit être spécifié sur l'étiquetage externe de l'emballage tertiaire avec la quantité nette de carboglace utilisé et le nom scientifique du réfrigérant. Attention, la manipulation de carboglace est dangereuse, elle peut occasionner de graves brûlures et doit donc se faire uniquement avec des gants, des lunettes de protection et une blouse.

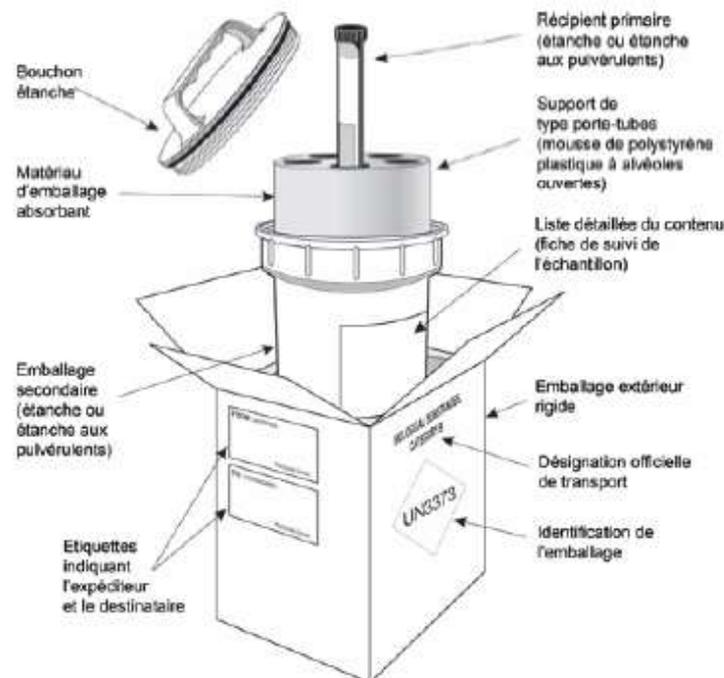


Figure 30 : exemple de triple emballage pour le transport d'un prélèvement appartenant à la catégorie B (International Air Transport Association, 2013) :

Enfin, les emballages de prélèvements de matières infectieuses appartenant à la catégorie B ont un marquage externe codifié (World Health Organization, 2017). En effet, chaque colis doit porter les informations suivantes :

- Pour le transport aérien uniquement : le nom, le numéro de téléphone et l'adresse d'une personne au courant de l'expédition ainsi que ceux du transporteur (ou de l'expéditeur).
- Le nom, le numéro de téléphone et l'adresse du destinataire.
- La désignation officielle de transports « BIOLOGICAL SUBSTANCE, CATEGORY B » apposée à côté de la marque en forme de losange visible sur la figure 31.



Figure 31 : étiquette pour les matières infectieuses de la catégorie B (World Health Organization, 2017) :

Il existe cependant des exceptions pour les prélèvements *post-mortem* en faune sauvage qui ne font pas partie de la catégorie B ou qui ne sont pas contraints de respecter la réglementation préalablement décrite. Par exemple, les prélèvements sanguins sur papier buvard ne sont pas soumis à cette réglementation tout comme les autres prélèvements sur papiers buvards car ils permettent d'inactiver les agents infectieux (à l'exception des prions) (World Health Organization, 2017 ; GEHealthcareLife Sciences, 2011) . En outre, les prélèvements d'origine animale qui présentent un risque minimal de contenir des agents pathogènes ne sont pas soumis à ce règlement s'ils sont transportés dans un emballage conçu pour éviter toute fuite et portant la mention « Échantillon animal exempté » (World Health Organization, 2017). Nous conseillons donc d'utiliser le triple emballage décrit précédemment tout en changeant l'étiquetage.

Pour tout autre information, le mieux est de consulter le document de l'OMS et contacter le laboratoire d'analyse auquel les prélèvements sont destinés (notamment pour les expéditions à l'étranger).

III.4.4. Transfert de prélèvements dangereux ou susceptibles d'être dangereux :

Les prélèvements appartenant à la catégorie A sont définis comme des échantillons infectieux qui, de la manière dont ils sont transportés, peuvent, lorsqu'une exposition se produit, provoquer une invalidité permanente ou une maladie mortelle ou potentiellement mortelle chez l'homme ou l'animal, jusque-là en bonne santé (Institut Pasteur, 2016 ; World Health Organization, 2017). La liste de ces échantillons infectieux est disponible dans l'Annexe 4.

Cette fois, les emballages de ces échantillons doivent respecter la norme P620 / UN2814 ou UN2900 selon leurs catégories. Ce sont des emballages qui ont subi de nombreux tests avant d'être homologués. Il est possible de se les procurer auprès de marchands et revendeurs spécialisés, ainsi qu'auprès de certains laboratoires d'analyses. Il s'agit là encore d'un triple emballage, les rôles des différentes parties sont les mêmes que ceux décrits précédemment (cf figure 32)

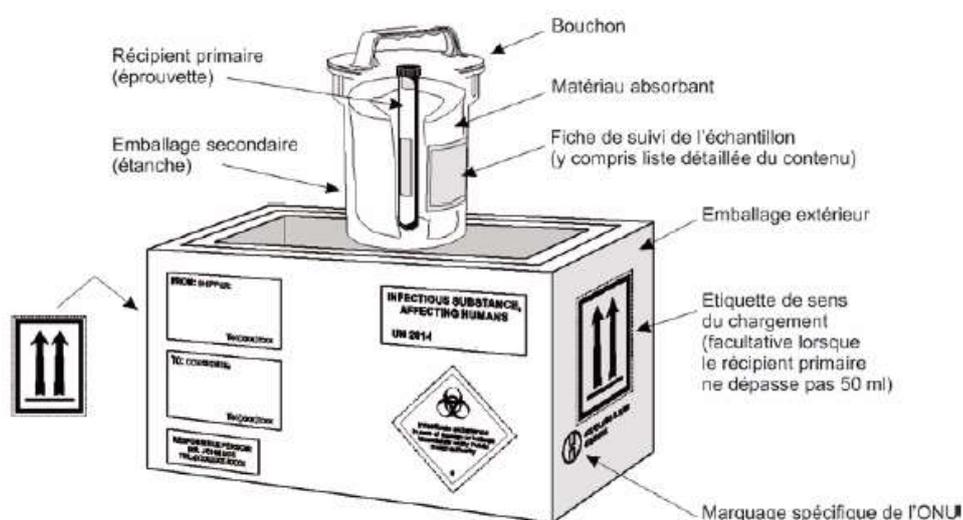


Figure 32 : exemple de triple emballage pour le transport d'un prélèvement appartenant à la catégorie A (International Air Transport Association, 2013) :

En ce qui concerne le marquage externe, il doit comporter :

- Le nom et l'adresse du destinataire.
- Le numéro de téléphone d'une personne au courant de l'envoi.
- Le nom et l'adresse de l'expéditeur.
- Le numéro de l'ONU suivi de la désignation officielle de transport (ONU 2814 « MATIÈRES INFECTIEUSES POUR L'HOMME » ou ONU 2900 « MATIÈRES INFECTIEUSES POUR LES ANIMAUX seulement », selon le cas)

- La quantité nette de carboglace utilisée et le nom scientifique du réfrigérant en cas d'utilisation de cette dernière.
- Un étiquetage réglementé, avec au minimum un logo en losange spécifiant la catégorie du prélèvement, visible en sur la figure 33.



Figure 33 : Étiquette de danger pour les matières infectieuses de la catégorie A et pour les micro-organismes et les organismes génétiquement modifiés répondant à la définition d'une matière infectieuse, catégorie A (World Health Organization, 2017) :

III.4.5. Archivage des prélèvements :

Dans certains cas de figures, les prélèvements ne peuvent pas être envoyés immédiatement ou sont tout simplement archivés en **vue d'une utilisation ultérieure** selon les résultats des premiers examens complémentaires. Ils peuvent également être archivés pour constituer une bibliothèque de prélèvements. Dans tous ces cas de figures, un registre papier ou informatique des différents prélèvements doit être mis en place et complété le plus **fréquemment possible** afin de ne pas perdre la trace d'un échantillon et pouvoir le retrouver facilement.

Pour conserver des échantillons sur le long terme, le moyen de stockage dépend du type de prélèvement et de leur intérêt futur (Terio et al., 2018) :

- Pour les prélèvements bactériologiques, virologiques et fongiques, **l'idéal est la congélation à -80°C.**
- **Les prélèvements d'acides nucléiques sur papier buvard peuvent être conservés à température ambiante pendant plusieurs années (pour plus d'informations, nous conseillons de se reporter à la notice d'utilisation des différents papiers).**
- Pour les prélèvements histologiques, la conservation se fait à température ambiante, les tissus étant fixés dans une solution de formol à 10%. Il faut simplement veiller à

éviter toute **fuite de formol et s'en prémunir** en disposant des matières absorbantes **autour des pots dans l'espace de stockage.**

- Les prélèvements de parasites peuvent être conservés dans du formol à 10% ou de l'éthanol à 70° à température ambiante. Là encore, il convient de faire attention à toute fuite potentielle.
- Les prélèvements toxicologiques peuvent être conservés à -80°C (ou à défaut, à -20°C)
- Pour les prélèvements génétiques, la conservation sur des supports tels que des papiers buvards peut se faire à température ambiante. La congélation à -80°C permet également de conserver les prélèvements sur le long terme, tout comme l'éthanol absolu.
- Pour les prélèvements cytologiques : une fois les lames fixées, elles peuvent être conservées longtemps, à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Pour tous les prélèvements qui sont à conserver au congélateur, il est très important de vérifier que ce dernier ne passe pas par des cycles gel/dégel. En effet, cela impacterait fortement la viabilité des échantillons et leur valeur biologique (Terio et al., 2018).

III.5. DEVENIR DE LA ZONE DE DECOUVERTE DU CADAVRE POST-AUTOPSIE ET ELIMINATION DU CORPS :

III.5.1. Principes généraux sur le devenir de la zone de découverte :

Lorsque les prélèvements sont finis et prêts à être transférés, il reste une dernière étape à effectuer : **la désinfection de la zone.** En effet, les corps d'animaux sauvages sont souvent la source primaire de dissémination de nombreux agents pathogènes, il est donc primordial d'éliminer cette source de contamination.

Selon les articles L. 226-1 et R. 226-12 du code rural, les carcasses des animaux de moins de 40 kg peuvent être enterrées par n'importe qui, et celles de plus de 40 kg relèvent de la mairie (de la commune sur lequel se trouve le corps). Ces dernières confient généralement l'élimination du cadavre au service d'équarrissage (Legifrance, 2006 ; 2015). Ainsi, l'élimination du corps après une autopsie sur le terrain ne relève pas de l'équipe d'autopsie, qui n'a aucune obligation de réaliser cette tâche. Toutefois, dans certains cas (maladies infectieuses suspectées), l'élimination du corps paraît essentielle afin d'éviter toute contamination ultérieure. En outre, la désinfection de la zone de découverte ainsi que celle du matériel et des tenues utilisés paraît être un minimum. En effet, les tissus en décomposition peuvent contaminer l'environnement et certains agents microbiologiques résistent jusqu'à plusieurs semaines dans le milieu extérieur. Par ailleurs, dans certains cas de maladies

réglementées, comme la peste porcine africaine, il existe des méthodes d'élimination très précises qui sont décrites par l'ONCFS et le réseau SAGIR (SAGIR et al., 2011). Ici, nous **décrivons donc les méthodes usuelles d'élimination** mais en cas de suspicion de certaines maladies, il est toujours important de contacter la mairie ou le réseau SAGIR pour avoir de plus amples informations sur la marche à suivre.

Les membres de l'équipe qui s'occupent de la partie nettoyage-désinfection voire de l'élimination de la carcasse, doivent porter une tenue de protection composée d'un habit jetable ou réutilisable, de bottes, de gants en latex ou de gants de protection réutilisables, d'un masque et d'une charlotte ou toute autre protection capillaire (Friend, United States Geological Survey, 1999).

III.5.2. Élimination de la carcasse :

Il existe plusieurs méthodes d'élimination d'un corps :

- **L'incinération sur place : c'est la méthode idéale car elle permet l'élimination de tout agent pathogène et de toute matière infectieuse.** En effet, la chaleur est un bon moyen de détruire les micro-organismes. Toutefois, cette pratique doit être bien encadrée. Il **ne faut jamais utiliser d'essence pour allumer un feu. Il est inconcevable de pratiquer une incinération par temps sec, dans un lieu où il y a de la végétation.** Enfin, il est impératif de faire attention à la puissance et à la direction du vent avant toute action.
- **L'enfouissement du corps : c'est une méthode alternative moins dangereuse pour l'environnement alentours. Il est conseillé d'ensevelir la carcasse sous environ un mètre de terre.** Il est également conseillé de rajouter de la chaux sur le corps (Friend, United States Geological Survey, 1999). Il est néanmoins important de vérifier si le terrain n'a pas trop de risque de drainage avant de creuser. Si c'est le cas, il vaut mieux choisir une autre solution.
- **L'équarrissage :** dans ce cas, il y a deux solutions : soit nous prévenons la mairie ou l'entreprise chargée de l'équarrissage et cette dernière fait le nécessaire pour aller chercher le corps ; soit **c'est l'équipe qui amène le corps jusqu'à l'usine de traitement** (dans ce cas le corps doit être protégé dans deux sacs étanches (cf partie III.1.3). La première solution est à privilégier pour minimiser les risques de contamination sauf si la carcasse présente des risques importants de consommation par des charognards.

L'élimination sur place est à privilégier car il n'y a pas de risques de dissémination associés au déplacement de matériel contaminé. Cependant, elle **peut s'avérer difficile à mettre en place, dans ce cas, faire appel à une société d'équarrissage reste la solution privilégiée.**

III.5.3. Désinfection de la zone de découverte et de l'équipe :

Le premier but de l'étape de désinfection est de prévenir la transmission mécanique des différents agents infectieux rencontrés sur le terrain. La transmission peut être due aux **hommes, à l'équipement de l'équipe ou aux véhicules** (Friend, United States Geological Survey, 1999). Le second objectif de cette étape est de limiter la persistance de certains **agents infectieux dans l'environnement. Ainsi**, certains virus, comme les parvovirus ou les calicivirus, résistent plusieurs semaines voire plusieurs mois dans **l'environnement et peuvent donc contaminer d'autres individus** (Markey, 2013).

Pour la désinfection de la zone, plusieurs désinfectants peuvent être employés (Friend, United States Geological Survey, 1999 ; Terio et al., 2018):

- L'alcool à 70°
- Le borate de soude
- La chaux
- La soude à 0,5%
- Le chlore (1 volume pour 10 volumes d'eau)
- Des désinfectants industriels comme le Virkon®

Le choix du produit désinfectant doit être adapté à la situation. Les tenues de protection **doivent être portées pendant l'étape de désinfection de l'environnement**. Elles sont ensuite lavées ou jetées.

Pour la seconde partie de la désinfection, nous pouvons également donner plusieurs conseils (Friend, United States Geological Survey, 1999) :

- Désinfecter les bottes et chaussures avant de partir de la zone de découverte ou à minima avant de pénétrer dans le véhicule de retour.
- Désinfecter tout le matériel utilisé sur place avant de quitter la zone. Une fois les instruments désinfectés, **il faut les rincer afin d'éviter leur corrosion**.
- Si des véhicules ont cheminé **jusqu'à la zone de découverte, il faut les laver** dans une station de lavage et également faire attention à bien désinfecter les pneus ainsi que le dessous du véhicule.
- Les **membres de l'équipe doivent se désinfecter et se laver les mains après l'autopsie**. Il est déconseillé de se rendre dans des zones de population animale dans les sept jours suivant un cas de **suspicion d'une maladie contagieuse**.

CONCLUSION :

Cette étude, issue de données bibliographiques et d'éléments recueillis auprès de plusieurs vétérinaires français experts, a permis de dégager des bonnes pratiques pour la réalisation de prélèvements *post-mortem* en faune sauvage.

Aujourd'hui, les autopsies réalisées en faune sauvage, associées à des examens complémentaires s'appuyant des prélèvements *post-mortem* de bonne qualité, permettent de disposer de données essentielles pour l'épidémiosurveillance des maladies dans un contexte d'enjeux de santé globale (One Health).

Nous avons décrit les différents prélèvements possibles selon les conditions de conservation du cadavre et il faut retenir qu'il est possible d'effectuer certains de ces prélèvements même sur un cadavre en état de décomposition avancée.

Par ailleurs, une fois arrivé sur le lieu de découverte du cadavre, il est important de prendre la décision de le transporter dans un laboratoire afin de l'autopsier ou, au contraire, de réaliser l'examen *post-mortem* sur place.

Nous avons souligné l'importance de réaliser des prélèvements adaptés aux analyses souhaitées. Il est également essentiel de collecter de la bonne manière, afin d'avoir les meilleurs échantillons possibles. En outre, toutes ces étapes n'ont que peu d'utilité si le prélèvement est mal conservé par la suite.

Enfin, toute prise d'essai doit être effectuée de la manière la plus sécuritaire possible, que ce soit pour l'équipe mais également pour l'ensemble de la faune situé à proximité du lieu de collecte.

C'est donc cet ensemble de plusieurs paramètres qui permet d'obtenir les meilleurs résultats possibles à partir des prélèvements *post-mortem* en faune sauvage.

Bibliographie :

AEGERTER, Philippe et GOLDBERG, Marcel, 2009. Biais de mesure (d'information). In : *Epidémiologie Assistée par Ordinateur* [en ligne]. 2009. [Consulté le 29 novembre 2019]. Disponible à l'adresse : http://www.pifo.uvsq.fr/epideao/esp/chap_4/biais_de_mesure_dinformation.html.

AFSSET, 2009. *Risques sanitaires liés à la présence de formaldéhyde*.

ARBOUCALOT, Charlène, 2017. *Procédures à suivre lors d'autopsies médico-légales vétérinaires dans le cadre d'enquêtes criminelles*. Thèse pour l'obtention du grade de docteur vétérinaire. Université Claude Bernard - Lyon I.

ARENAS-MONTES, Antonio, GARCÍA-BOCANEGRA, Ignacio, PANIAGUA, Jorge, FRANCO, Juan José, MIRÓ, Francisco, FERNÁNDEZ-MORENTE, Manuel, CARBONERO, Alfonso et ARENAS, Antonio, 2013. Blood sampling by puncture in the cavernous sinus from hunted wild boar. In: *European Journal of Wildlife Research*. Avril 2013. Vol. 59, n° 2, p. 299-303.

AVIAGEN, 2015. *How To Take FTA Card Samples*. 2015.

BAOS, Raquel, JOVANI, Roger, PASTOR, Nuria, TELLA, José L., JIMÉNEZ, Begoña, GÓMEZ, Gemma, GONZÁLEZ, María J. et HIRALDO, Fernando, 2006. Evaluation of genotoxic effects of heavy metals and arsenic in wild nestling white storks (*Ciconia ciconia*) and black kites (*milvus migrans*) from southwestern Spain after a mining accident. In: *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2006. Vol. 25, n° 10, p. 2794.

BENJDIA, Ismaël, 2009. *Evaluation de l'exposition à l'acide peracétique : enquête sur les symptômes allégués par le personnel réalisant la désinfection du matériel endoscopique*. Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en médecine. Université Paris Val-de-Marne, Faculté de médecine de Créteil.

BERNY, Philippe et QUEFFÉLEC, Stéphane, 2014. *Guide pratique de toxicologie clinique vétérinaire*. Paris: Éd. Med'com.

BROOKS, J. W., 2016. Post-mortem Changes in Animal Carcasses and Estimation of the Post-mortem Interval. In: *Veterinary Pathology*. Septembre 2016. Vol. 53, n° 5, p. 929-940.

CAMPBELL, Terry W., 2015. *Exotic animal haematology and cytology*. Fourth edition. Ames, Iowa : John Wiley & Sons Inc.

CHANTREY, Julian, DALE, Timothy D., READ, Jonathan M., WHITE, Steve, WHITFIELD, Fiona, JONES, David, MCINNES, Colin J. et BEGON, Michael, 2014. European red squirrel population dynamics driven by squirrelpox at a gray squirrel invasion interface. In: *Ecology and Evolution*. Octobre 2014. Vol. 4, n° 19, p. 3788-3799.

CHENESSEAU, Delphine, 2011. Le réseau SAGIR « Surveiller pour agir ». In : *Rev. sci. Bourgogne-Nature*. 2011. n° 14, p. 151-154.

CLINISCIENCES, 2019. Liquide de Bouin Clinisciences. In : *CliniSciences* [en ligne]. 2019. [Consulté le 29 novembre 2019]. Disponible à l'adresse : <https://www.clinisciences.com/achat/cat-liquide-de-bouin-3761.html>.

COOPER, John E., 2009. In-practice and Field Techniques for the Investigation of Parasitic Infections. In: *Journal of Exotic Pet Medicine*. Octobre 2009. Vol. 18, n° 4, p. 289-298.

CURRY, Patricia S., RIBBLE, Carl, SEARS, William C., ORSEL, Karin, HUTCHINS, Wendy, GODSON, Dale, LINDSAY, Robbin, DIBERNARDO, Antonia, CAMPBELL, Mitch et KUTZ, Susan J., 2014. Blood collected on filter paper for wildlife serology: evaluating storage and temperature challenges of field collections. In: *Journal of Wildlife Diseases*. 1 Avril 2014. Vol. 50, n° 2, p. 308.

DABIS, François et DESENCLOS, Jean-Claude, 2017. *Epidémiologie de terrain (2e édition): Méthodes et applications*. [En ligne]. Montrouge : JOHN LIBBEY EUROTEXT. [Consulté le 29 novembre 2019]. ISBN 978-2-7420-1528-3. Disponible à l'adresse : <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=1631199>.

DACHEUX, Laurent et BOURHY, Hervé, 2011. Le diagnostic de la rage. In : *Revue Francophone des Laboratoires*. Mars 2011. Vol. 2011, n° 430, p. 33-40.

DAWE, Robert J., BENNETT, David A., SCHNEIDER, Julie A., VASIREDDI, Sunil K. et ARFANAKIS, Konstantinos, 2009. Post mortem MRI of human brain hemispheres: T2 relaxation times during formaldehyde fixation. In: *Magnetic Resonance in Medicine*. Avril 2009. Vol. 61, n° 4, p. 810-818.

DE VOS, V et TURNBULL, P.G.B, 2004. Anthrax. In: COETZER, J. A. W. et TUSTIN, R. C. (éd.), *Infectious diseases of livestock*. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press.

DECORS ET MASTAIN, Mastain, 2010. *Épidémiosurveillance de la faune sauvage Bilan des analyses effectuées de 2006 à 2008 dans le cadre du réseau SAGIR*. Office national de la chasse et de la faune sauvage Direction des études et de la recherche.

DELAHAY, R.J., CHEESEMAN, C.L. et CLIFTON-HADLEY, R.S., 2001. Wildlife disease reservoirs: the epidemiology of Mycobacterium bovis infection in the European badger (*Meles meles*) and other British mammals. In : *Tuberculosis*. Février 2001. Vol. 81, n° 1-2, p. 43-49.

DIERAUF, Leslie A. et GULLAND, Frances M. D. (éd.), 2001. *CRC handbook of marine mammal medicine*. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press.

DINIS-OLIVEIRA, R. J., CARVALHO, F., DUARTE, J. A., REMIÃO, F., MARQUES, A., SANTOS, A. et MAGALHÃES, T., 2010. Collection of biological samples in forensic toxicology. In: *Toxicology Mechanisms and Methods*. Septembre 2010. Vol. 20, n° 7, p. 363-414.

DOKGÖZ, H, ARICAN, N, ELMAS, I et FINCANCI, S.K, 2001. Comparison of morphological changes in white blood cells after death and in vitro storage of blood for the estimation of post-mortem interval. In: *Forensic Science International*. Décembre 2001. Vol. 124, n° 1, p. 25-31.

DOVE, Carla J., DAHLAN, Nor F., HEACKER, Marcy A. et WHATTON, James F., 2011. Using Whatman FTA® Cards to Collect DNA for Bird-Strike Identifications. In : *Utah State University* [en ligne]. 2011. [Consulté le 29 novembre 2019]. Disponible à l'adresse : <https://digitalcommons.usu.edu/hwi/vol5/iss2/10/>.

DUFOUR, Barbara, HENDRIKX, Pascal et THONNAT, Jérôme, 2011. *Surveillance épidémiologique en santé animale* [en ligne]. Versailles : Éditions Quæ. [Consulté le 29 novembre 2019]. Disponible à l'adresse : <http://public.ebookcentral.proquest.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=3398893>.

EROS, C et GREAT BARRIER REEF MARINE PARK AUTHORITY, 2007. *Procedures for the salvage and necropsy of the Dugong (Dugong Dugon)*. Townsville, Qld. : Great Barrier Reef Marine Park Authority.

ESA, 2019. Faune sauvage | Plateforme d'épidémiosurveillance en santé animale. In : *Plateforme d'épidémiosurveillance en santé animale* [en ligne]. 2019. [Consulté le 8 décembre 2019]. Disponible à l'adresse : <https://www.pplateforme-esa.fr/mots-cles/faune-sauvage>.

FLEURY-FEITH, J. et BERNAUDIN, J.-F., 2011. Les examens cytologiques en cancérologie bronchopulmonaire. In : *Revue des Maladies Respiratoires*. Février 2011. Vol. 28, n° 2, p. 254-265.

FORENSIC WORKING GROUP, 2014. *Wildlife DNA Sampling Guide*. 2014.

FOREYT, Bill, 2001. *Veterinary parasitology reference manual*. 5th ed. Ames, Iowa : Iowa State University Press. 2001

FOREYT, W. J., 1986. Recovery of nematode eggs and larvae in deer: evaluation of fecal preservation methods. In: *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1 Novembre 1986. Vol. 189, n° 9, p. 1065-1067.

FRIEND, Milton et UNITED STATES GEOLOGICAL SURVEY (éd.), 1999. *Field manual of wildlife diseases: general field procedures and diseases of birds*. Washington, D.C: U.S. Dept. of the Interior, U.S. Geological Survey. Information and technology report, 1999

GAUR, Ajay, GOVINDHASWAMY, Umapathy, KARTHIKEYAN, Vasudevan, SADANAND, Sontakke et SAMABASIVA, Rao, 2017. *Manual for Biological Sample Collection and Preservation for Genetic, Reproductive and Disease Analyses*. 2017. Central Zoo Authority & Laboratory for the Conservation of Endangered Species (LaCONES) CSIR- Centre for Cellular and Molecular Biology.

GAUTHIER, Dominique, LEMBERGER, Karine et DECORS, Anouk, 2016. *Vade-mecum des laboratoires départementaux d'analyses vétérinaires – Édition 2016 Le diagnostic des maladies de la faune sauvage libre*. 2016.

GAVIER-WIDÉN, Dolores, DUFF, Paul et MEREDITH, Anna (éd.), 2012. *Infectious diseases of wild mammals and birds in Europe*. Chichester: Wiley.

GEHEALTHCARELIFE SCIENCES, 2011. *FTA™ cards*. 2011.

GIBERT, Philippe, 2018. *Surveillance sanitaire de la faune sauvage : l'œil d'un vétérinaire pas comme les autres : manuel pratique*.

GOULD, Ernest A., 1999. Methods for Long-Term Virus Preservation. In : *Molecular Biotechnology*. 1999. Vol. 13, n° 1, p. 57-66.

GRÉGOIRE, Léa, 2012. *La cystocentèse chez le chat : conception d'images descriptives et évaluation de la variabilité inter-opérateur de la palpation vésicale*. Thèse pour l'obtention du grade de docteur vétérinaire. Université Paul Sabatier - Toulouse III.

GREINER, Ellis. C et MADER, Douglas R., 2006. Parasitology. In: MADER, Douglas R. (éd.), *Reptile medicine and surgery*. 2. ed. St. Louis, Mo: Saunders Elsevier. p. 343-364.

GWALTNEY-BRANT, S. M., 2016. Veterinary Forensic Toxicology. In: *Veterinary Pathology*. Septembre 2016. Vol. 53, n° 5, p. 1067-1077.

HARS, Jean, HORGNE, Jean-Marie Le, MAUCCI, Eric, PASQUIER, Jean-Jacques, VANISCOTTE, Amélie, MICK, Virginie et GARIN-BASTUJI, Bruno, 2013. Un foyer de brucellose chez les ongulés sauvages du massif du Bargy en Haute-Savoie. In : *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation*. 2013. n°60, p. 6.

HARS, Jean et ROSSI, Sophie, 2009. Résultats de la surveillance de maladies animales réputées contagieuses (MARC) dans la faune sauvage en France. In : *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*. 2009. n° 1, p. 215.

HESS, John R., 2010. Conventional blood banking and blood component storage regulation: opportunities for improvement. In : *Blood Transfusion* [en ligne]. 2010. [Consulté le 8 décembre 2019]. Disponible à l'adresse : <http://doi.org/10.2450/2010.003S>.

HUNGERFORD, Laura L., CAMPBELL, Charles Lee et SMITH, Arnold R., 1998. *Veterinary mycology laboratory manual*. 1st ed. Ames: Iowa State University Press.

INSTITUT PASTEUR, 2016. Cadre réglementaire matières infectieuses. In : *Institut Pasteur* [en ligne]. 2016. [Consulté le 1 décembre 2019]. Disponible à l'adresse : <https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/CNR/envoi-de-materiel-biologique/cadre-reglementaire>.

INTERNATIONAL AIR TRANSPORT ASSOCIATION, 2013. IATA - Home. In : [en ligne]. 2013. [Consulté le 9 décembre 2019]. Disponible à l'adresse : <https://www.iata.org/pages/default.aspx>.

JACOBSEN, Lone J., 2019. BiopSafe. In: [en ligne]. 2019. [Consulté le 8 décembre 2019]. Disponible à l'adresse : <https://biopsafe.com/>.

JONES, Kate E., PATEL, Nikkita G., LEVY, Marc A., STOREYGARD, Adam, BALK, Deborah, GITTLEMAN, John L. et DASZAK, Peter, 2008. Global trends in emerging infectious diseases. In: *Nature*. Février 2008. Vol. 451, n° 7181, p. 990-993.

KELLER, Alice, 2008. *Mise en place d'un système de suivi sanitaire de la faune sauvage dans le parc national de Souss-Massa (Maroc)*. Thèse pour l'obtention du grade de docteur vétérinaire. Université Claude Bernard - Lyon I.

KILPATRICK, William C., 2002. Noncryogenic Preservation of Mammalian Tissues for DNA Extraction: An Assessment of Storage Methods. In : *Biochemical Genetics*. 2002. Vol. 40, n° 1/2, p. 53-63.

LABORATOIRE DÉPARTEMENTAL VÉTÉRINAIRE ET D'HYGIÈNE ALIMENTAIRE DES HAUTES ALPES, 2019. *La fixation photographique*. 2019.

LAROUSSE, Éditions, 2019. Dictionnaire Français en ligne - Larousse. In : [en ligne]. 2019. [Consulté le 8 décembre 2019]. Disponible à l'adresse : <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais-monolingue>.

LEGIFRANCE, 2006. *Code rural et de la pêche maritime - Article R*226-12* [en ligne]. 17 mars 2006. [Consulté le 5 décembre 2019]. Disponible à l'adresse : <https://www.legifrance.gouv.fr/affichCode.do?cidTexte=LEGITEXT000006071367>.

LEGIFRANCE, 2007. *Code de l'environnement - Article R411-5* [en ligne]. 5 janvier 2007. [Consulté le 8 décembre 2019]. Disponible à l'adresse : <https://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?idArticle=LEGIARTI000006837703&cidTexte=LEGITEXT000006074220&dateTexte=20070105>.

LEGIFRANCE, 2015. *Code rural et de la pêche maritime - Article L226-1* [en ligne]. 6 juin 2015 [Consulté le 5 décembre 2019]. Disponible à l'adresse : <https://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?idArticle=LEGIARTI0000030679624&cidTexte=LEGITEXT000006071367&dateTexte=20150606>.

LEGIFRANCE, 2018. *Arrêté du 29 juillet 2013 relatif à la définition des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les espèces animales*. 18 juillet 2018.

MACKENSTEDT, Ute, JENKINS, David et ROMIG, Thomas, 2015. The role of wildlife in the transmission of parasitic zoonoses in peri-urban and urban areas. In : *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. avril 2015. Vol. 4, n° 1, p. 71-79.

MALLET, C, LOUZIS, C et DE LAVAUR, E, 1986. Essai de détermination des causes de mortalité du petit gibier sédentaire de plaine. Enquête des causes de mortalité sur les dix dernières années. In : *Bulletin Mensuel de l'Office National de la Chasse*. 1986. Vol. 102, p. 36-40.

MARCON, N, BRESSENOT, A, MONTAGNE, K, BASTIEN, C, CHAMPIGNEULLE, J et ALBUISSON, E, 2008. Etude comparative des propriétés fixatrices du formol et du glyoxal en pratique anatomopathologique. In : *Diaporama*. Nancy : CHU de Nancy. 2008.

MARKEY, Bryan K., 2013. *Clinical veterinary microbiology / Bryan K. Markey*. Second edition. Edinburgh London New York Oxford Philadelphia St Louis Sydney Toronto: Mosby Elsevier.

MAROUF, Abderrazak et TREMBLIN, Gérard, 2013. *Mémento technique à l'usage des biologistes et biochimistes*. Les Ulis : EDP sciences.

MCDONOUGH, Sean P et SOUTHARD, Teresa L, 2017. *The necropsy guide for dogs, cats, and small mammals*.

MCFADDEN, Whitney C., WALSH, Hadley, RICHTER, Felix, SOUDANT, Céline, BRYCE, Clare H., HOF, Patrick R., FOWKES, Mary, CRARY, John F. et MCKENZIE, Andrew T., 2019. Perfusion fixation in brain banking: a systematic review. In : *Acta Neuropathologica Communications*. Décembre 2019. Vol. 7, n° 1, p. 146.

MCGOWAN, Karin L., 2015. Specimen Collection, Transport, and Processing: Mycology. In : PFALLER, Michael A., RICHTER, Sandra S., FUNKE, Guido, JORGENSEN, James H., LANDRY, Marie Louise, CARROLL, Karen C. et WARNOCK, David W. (éd.), *Manual of Clinical Microbiology, 11th Edition* [en ligne]. American Society of Microbiology. p. 1944-1954. [Consulté le 29 novembre 2019]. Disponible à l'adresse : <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555817381.mcm11.ch114>.

MCKENZIE, Joanna, SIMPSON, Helen et LANGSTAFF, Ian, 2007. Development of methodology to prioritise wildlife pathogens for surveillance. In : *Preventive Veterinary Medicine*. Septembre 2007. Vol. 81, n° 1-3, p. 194-210.

MINISTÈRE CHARGÉ DE LA SANTÉ, 1998. *Guide de bonnes pratiques de désinfection des dispositifs médicaux*. 1998.

MORNER, T., OBENDORF, D.L., ARTOIS, M. et WOODFORD, M.H., 2002. Surveillance and monitoring of wildlife diseases. In : *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*. 1 avril 2002. Vol. 21, n° 1, p. 67-76.

MULLINEAUX, Elizabeth, 2016. *Bsava manual of wildlife casualties*.

MUNSON, Linda, 2013. *Necropsy of Wild Animals*. 2013. University Library, University of California, Davis.

NAGY, Zoltán Tamás, 2010. A hands-on overview of tissue preservation methods for molecular genetic analyses. In : *Organisms Diversity & Evolution*. mars 2010. Vol. 10, n° 1, p. 91-105.

OAKS, J. Lindsay, GILBERT, Martin, VIRANI, Munir Z., WATSON, Richard T., METEYER, Carol U., RIDEOUT, Bruce A., SHIVAPRASAD, H. L., AHMED, Shakeel, IQBAL CHAUDHRY, Muhammad Jamshed, ARSHAD, Muhammad, MAHMOOD, Shahid, ALI, Ahmad et AHMED KHAN, Aleem, 2004. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. In : *Nature*. Février 2004. Vol. 427, n° 6975, p. 630-633.

OEHMICHER, Manfred, AUER, Roland N. et KÖNIG, Hans Günter, 2009. *Forensic neuropathology and associated neurology*. Berlin: Springer.

OIE - WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (éd.), 2008. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). 2: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees)*. 6. ed. Paris : OIE.

ONCFS et ADILVA, 2019. *Fixation photographique Contexte PPA*. 2019.

ONCFS et ROSSI, Sophie, 2019. *Protocole d'extraction sanguine sur cadavre ou carcasse d'animal chassé à partir du sinus cérébelleux*. 2019.

PAETKAU, David, 2010. WGI - Wildlife Genetics International - Nelson British Columbia Canada. In : *Wildlife Genetics International* [en ligne]. 2010. [Consulté le 30 novembre 2019]. Disponible à l'adresse : <http://www.wildlifegenetics.ca/sampletypes.htm>.

POULETTY, Nicolas, 2019. *Prélèvement cytologique de lésions solides : Ponction à l'aiguille fine, impression, grattage et écouvillon* [en ligne]. 2019. Disponible à l'adresse : <https://www.vetodiag.fr/wp-content/uploads/2017/10/pr%C3%A9l%C3%A8vement-des-l%C3%A9sions-solides.pdf>.

RAMERY, Eve et LAYSSOL LAMOUR, Cathy, 2016. Cytologie : les clés pour un prélèvement réussi. In : *La semaine vétérinaire*. 2016. n° 1694.

RAMÓN-LACA, Ana, SORIANO, Laura, GLEESON, Dianne et GODOY, José Antonio, 2015. A simple and effective method for obtaining mammal DNA from faeces. In : *Wildlife Biology*. Juillet 2015. Vol. 21, n° 4, p. 195-203.

RANNOU, Benoît, 2018. L'outil cytologique en faune sauvage. 2018.

ROSSI, Sophie, HARS, Jean, LOUGUET, Yann, MASSE-PROVIN, Nathalie, POL, Françoise et LE POTIER, Marie-Frédérique, 2006. Gestion d'un réservoir sauvage : La peste porcine du sanglier (*Sus scrofa*). In : *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*. 2006. n° 1, p. 389.

SAGIR, ONCFS et FNC, 2011. *Le guide SAGIR pour les interlocuteurs techniques départementaux (ITD)*. 2011.

SAINSBURY, Anthony W., NETTLETON, Peter, GILRAY, Janice et GURNELL, John, 2000. Grey squirrels have high seroprevalence to a parapoxvirus associated with deaths in red squirrels. In : *Animal Conservation*. Août 2000. Vol. 3, n° 3, p. 229-233.

SAMANTA, Indranil, 2015. *Veterinary Mycology* [en ligne]. [Consulté le 29 novembre 2019]. Disponible à l'adresse : <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2280-4>.

SHAH, K, AGARWAL, Swapnil S., KUMAR, Lavlesh et CHAVALI, Krishnadutt H, 2015. Determining Post-Mortem Survival Period And Blood Group Antigenicity Of Red Blood Cells: A Cross- Sectional Study. In: *Anil Aggrawal's Internet Journal of Forensic Medicine and Toxicology*. 2015. Vol. 16, n° 2 (Juillet-Décembre 2015).

SPACKMAN, Erica, PEDERSEN, Janice C., MCKINLEY, Enid T. et GELB, Jack, 2013. Optimal specimen collection and transport methods for the detection of avian influenza virus and Newcastle disease virus. In : *BMC veterinary research*. 22 février 2013. Vol. 9, p. 35.

SYSTCHENKO, R, 2003. *L'acide peracétique (APA): avantages et inconvénients*. 2003.

TERIO, Karen A., MCALOOSE, Denise et ST. LEGER, Judith G. (éd.), 2018. *Pathology of wildlife and zoo animals*. Amsterdam : Academic Press.

TERRIER, Marie-Eve, PICARD, Evelyne, BARRAT, Jacques, GUIBE, Alain et CLIQUET, Florence, 2006. Surveillance sanitaire de la faune sauvage en France : Réseau SAGIR et épidémiologie de la rage des chiroptères. In : *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*. 2006. n° 1, p. 383.

THEMES, U. F. O., 2016. Sample Collection and Preparation. In: *Veterian Key* [en ligne]. 31 août 2016. [Consulté le 9 décembre 2019]. Disponible à l'adresse : <https://veteriankey.com/sample-collection-and-preparation-3/>.

TOMA, B, DUFOUR, Barbara, BENET, Jean-Jacques, SANAA, Moez, SHAW, Alexandra, MOUTOU, François et ASSOCIATION POUR L'ÉTUDE DE L'ÉPIDÉMIOLOGIE DES MALADIES ANIMALES, 2010. *Épidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures*.

TOUZET, Claire, 2007. *Particularités cliniques et difficultés thérapeutiques rencontrées chez les oiseaux et les reptiles de compagnie – apports de la pharmacovigilance et étude de cas*. Thèse pour l'obtention du grade de docteur vétérinaire. Université Claude Bernard - Lyon I.

UNIVERSITY OF ALASKA FAIRBANKS, 2019. UAF Home | University of Alaska Fairbanks. In : [en ligne]. 2019. [Consulté le 9 décembre 2019]. Disponible à l'adresse : <https://reindeer.salrm.uaf.edu/gallery/Animal%20Health/>.

VIKAS, Kumar, 2015. Wildlife DNA Evidence: Recognition, Collection and Preservation. In : *Research Journal of Forensic Sciences*. 2015. Vol. 3, p. 8-15.

VINER, T.C, 2015. Special considerations for specimen collections that may be involved in law enforcement cases. In: FRANSON, JC, FRIEND, Milton et GIBBS, *Field manual of wildlife diseases: U.S. Geological Survey Techniques and Methods*. 15–C7.

VOGELNEST, Larry, WOODS, Rupert et PROQUEST (FIRM), 2008. *Medicine of Australian mammals* [en ligne]. Collingwood, Vic.: CSIRO Publishing. [Consulté le 29 novembre 2019]. ISBN 978-0-643-09150-4. Disponible à l'adresse : <http://ebookcentral.proquest.com/lib/uwsau/detail.action?docID=474364>.

WARNS-PETIT, Eva, ARTOIS, Marc et CALAVAS, Didier, 2009. Biosurveillance de la faune sauvage. In : *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*. 2009. n° 1, p. 205.

WILLIAMS, Elizabeth S et BARKER, Ian K, 2001. *Infectious diseases of wild mammals*. Ames: Iowa State University Press.

WOODFORD, M. H., KEET, D. F. et BENGIS, R. G., 2000. *Post-mortem procedures for wildlife veterinarians and field biologists*. Paris : Office Internat. des Epizooties.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017. *Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2017–2018*. 2017. Organisation mondiale de la Santé.

ZEMANOVA, Miriam A., 2019. Poor implementation of non-invasive sampling in wildlife genetics studies. In: *Rethinking Ecology*. 16 juillet 2019. Vol. 4, p. 119-132.

Annexe 2 : Les différents prélèvements environnementaux réalisables en toxicologie de terrain (Arboucalot, 2017 ; Gwaltney-Brant, 2016) :

Prélèvements	Quantité	Conditionnement	Température de conservation	Analyses possibles
Nourriture / Appât	500 – 1000 g	<ul style="list-style-type: none"> Humide : récipient rigide Solide/sec : sac en papier 	<ul style="list-style-type: none"> Humide : 4°C / -20°C Solide/sec : température ambiante 	Pesticides, Mx L Ionophores, Alca, Cya, Mycotx, AVK
Eau	10 – 1000 mL	<ul style="list-style-type: none"> Récipient rigide 	<ul style="list-style-type: none"> 4°C / -20°C 	Pesticides, Mx L NO ₃ , Na, Cyanobactéries
Plante	Entière, 2 échantillons minimum	<ul style="list-style-type: none"> Séchée entre deux livres : sac en papier Fraîche : récipient rigide 	<ul style="list-style-type: none"> Sec: température ambiante Fraîche: 4°C / -20°C 	Alca, NO ₃ , Pesticides, Glycosides
Champignon	Entier	<ul style="list-style-type: none"> Séché : sac en papier Frais : récipient rigide 	<ul style="list-style-type: none"> Sec: température ambiante Frais: 4°C / -20°C 	Hépatotoxique s, Peptides
Sol	250 – 500 g	<ul style="list-style-type: none"> Récipient rigide 	<ul style="list-style-type: none"> Température ambiante / 4°C 	Pesticides, Mx L

Abréviations : Alca = Alcaloïdes ; AVK = antivitamines K ; Cya = Cyanure ; Mx L = Métaux lourds ; Mycotx = Mycotoxines ; Na = Sodium ; NO₃ = Nitrate

Annexe 3 : listes de certaines maladies zoonotiques rencontrées lors de la réalisation de prélèvement sur des animaux sauvages (SAGIR et al., 2011 ; Dacheux, Bourhy, 2011 ; Gavier-Widén et al., 2012) :

Nom de la maladie	Borreliose (maladie de Lyme)	Brucellose	Échinococcose	Rage
Agent infectieux	<i>Borrelia burgdorferi</i> Bactérie	<i>Brucella suis</i> +++ <i>Brucella abortus</i> Bactérie	<i>Echinococcus multilocularis</i> Parasite (cestode)	<i>Lyssavirus</i> Virus
Espèces animales porteuses	Tiques : <i>Ixodes ricinus</i> Chevreuil = hôte n°1 pour cette tique (mais présente chez de nombreux mammifères)	Sanglier, lièvre Mais surtout bétail domestique	Renard (parfois chien)	Renard surtout (potentiellement toutes espèces)
Modes de contamination	Morsure de tique	Manipulation de viscères ou lésions Ingestion de produits laitiers	Contact avec le pelage souillé Ingestion de produits souillés	Manipulation d'un cadavre souillé par de la salive Morsure ou griffure
Gravité des symptômes chez l'homme	Peu grave – curable	Grave mais curable	Grave si non traité précocement	Incurable dès l'apparition des symptômes
Traitement	Traitement médical (antibiotiques divers) d'autant plus efficace que précoce	Traitement médical (antibiotiques) long, d'autant plus efficace que précoce	Traitement médical + chirurgical efficace si diagnostic précoce	Aucun traitement si symptômes apparus, sérovaccination conseillée après morsure suspecte
Prévention	Vêtements longs Utilisation de répulsifs	Respect consignes d'hygiène (alimentaire notamment)	Éviter conduites « à risque »	Vaccination préventive
Diagnostic et dépistage	Sérologie spécifique	Symptômes + labo sérologie spécifique	Symptômes + labo Sérologie spécifique	Traiter immédiatement si suspicion, Diagnostic par RT-PCR sur biopsie cutanée
Statut légal	Maladie professionnelle	Déclaration obligatoire Maladie professionnelle	Aucun	Déclaration obligatoire Maladie professionnelle

Nom de la maladie	Rouget	Tuberculose	Tularémie	Salmonellose
Agent infectieux	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> Bactérie	<i>Mycobacterium bovis</i> Bactérie	<i>Francisella tularensis</i> Bactérie	<i>Salmonella sp.</i> Bactérie
Espèces animales porteuses	Faisan, sanglier	Cervidés surtout d'élevage	Lièvre	Oiseaux surtout (potentiellement tous vertébrés)
Modes de contamination	Inoculation lors de manipulation de cadavres ou de viscères	Inoculation lors de manipulation de lésions (autopsies) Ingestion (lait +++)	Simple manipulation d'un lièvre malade ou de son cadavre	Manipulation de produits virulents + mains non lavées Ingestion
Gravité des symptômes chez l'homme	Peu grave et curable	Grave mais curable	Curable mais guérison tardive douloureux)	Variable selon le mode d'infection et le sérotype
Traitement	Traitement médical à base d'antibiotiques (pénicilline)	Traitement médical à base d'antibiotiques	Traitement médical à base d'antibiotiques Doit être précoce	Traitement médical à base d'antibiotiques
Prévention	Gants, désinfection rapide des blessures	Vaccination (BCG)	Respect des consignes (port de gants) Ne pas examiner la carcasse sur le terrain si suspicion	Respect des règles d'hygiène
Diagnostic et dépistage	Symptômes cutanés	Symptômes, radio, timbre, intra-dermo	Difficile (laboratoire + intra-dermo ou sérologie)	Symptômes + laboratoire
Statut légal	Aucun	Déclaration obligatoire Maladie professionnelle	Déclaration obligatoire Maladie professionnelle	Déclaration obligatoire si intoxication collective

Annexe 4 : exemple de matières infectieuses appartenant à la catégorie A de l'OMS (World Health Organization, 2017) :

EXEMPLES DE MATIÈRES INFECTIEUSES CLASSÉES DANS LA CATÉGORIE A SOUS QUELQUE FORME QUE CE SOIT, SAUF INDICATION CONTRAIRE	
N° ONU et désignation officielle de transport	Micro-organisme
ONU 2814 Matière infectieuse pour l'homme	<i>Bacillus anthracis</i> (culture seulement)
	<i>Brucella abortus</i> (culture seulement)
	<i>Brucella melitensis</i> (cultures seulement)
	<i>Brucella suis</i> (cultures seulement)
	<i>Burkholderia mallei</i> – <i>Pseudomonas mallei</i> – morve (cultures seulement)
	<i>Burkholderia pseudomallei</i> – <i>Pseudomonas pseudomallei</i> (cultures seulement)
	<i>Chlamydia psittaci</i> – souches aviaires (cultures seulement)
	<i>Clostridium botulinum</i> (cultures seulement)
	<i>Coccidioides immitis</i> (cultures seulement)
	<i>Coxiella burnetii</i> (cultures seulement)
	Virus de la fièvre hémorragique de Crimée et du Congo
	Virus de la dengue (cultures seulement)
	Virus de l'encéphalite équine orientale (cultures seulement)
	<i>Escherichia coli</i> , verotoxinogène (cultures seulement) ¹
	Virus d'Ebola
	Virus flexal
	<i>Francisella tularensis</i> (cultures seulement)
	Virus de Guanarito
	Virus Hantaan
	Hantavirus provoquant la fièvre hémorragique avec syndrome rénal
	Virus Hendra
	Virus de l'hépatite B (cultures seulement)
	Virus de l'herpès B (cultures seulement)
	Virus de l'immunodéficience humaine (cultures seulement)
	Virus hautement pathogène de la grippe aviaire (cultures seulement)
	Virus de l'encéphalite japonaise (cultures seulement)
	Virus de Junin
	Virus de la maladie de la forêt de Kyasanur
	Virus de la fièvre de Lassa
	Virus de Machupo
	Virus de Marbourg
Virus de la variole du singe	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (cultures seulement) ¹	
Virus de Nipah	

EXEMPLES DE MATIÈRES INFECTIEUSES CLASSÉES DANS LA CATÉGORIE A SOUS QUELQUE FORME QUE CE SOIT, SAUF INDICATION CONTRAIRE	
	Virus de la fièvre hémorragique d'Omsk
	Poliovirus (cultures seulement)
	Virus de la rage (cultures seulement)
	<i>Rickettsia prowazekii</i> (cultures seulement)
	<i>Rickettsia rickettsii</i> (cultures seulement)
	Virus de la fièvre de la vallée du Rift (cultures seulement)
	Virus de l'encéphalite vernoestivale russe (cultures seulement)
	Virus de Sabia
	<i>Shigella dysenteriae</i> type 1 (cultures seulement) ¹
	Virus de l'encéphalite à tiques (cultures seulement)
	Virus de la variole
	Virus de l'encéphalite équine du Venezuela (cultures seulement)
	Virus du Nil occidental (cultures seulement)
	Virus de la fièvre jaune (cultures seulement)
	<i>Yersinia pestis</i> (cultures seulement)
ONU 2900 Matière infectieuse pour les animaux uniquement	Virus de la fièvre porcine africaine (cultures seulement)
	Paramyxovirus aviaire type 1 – virus de la maladie de Newcastle vélogénique (cultures seulement)
	Virus de la peste porcine classique (cultures seulement)
	Virus de la fièvre aphteuse (cultures seulement)
	Virus de la dermatose nodulaire (cultures seulement)
	<i>Mycoplasma mycoides</i> – péripneumonie contagieuse bovine (cultures seulement)
	Virus de la peste des petits ruminants (cultures seulement)
	Virus de la peste bovine (cultures seulement)
	Virus de la variole ovine (cultures seulement)
	Virus de la variole caprine (cultures seulement)
	Virus de la maladie vésiculeuse du porc (cultures seulement)
	Virus de la stomatite vésiculaire (cultures seulement)

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné, Guillaume LE LOC'H, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **Arnaud FARRE** intitulée « **Guide de bonnes pratiques pour les prélèvements biologiques sur la faune sauvage** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 25/11/2019
Docteur Guillaume LE LOC'H
Maitre de Conférences
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



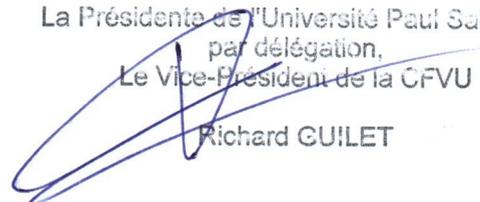
Vu :
Le Directeur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Pierre SANS




Vu :
Le Président du jury :
Professeur Gérard CAMPISTRON



Vu et autorisation de l'impression :
Présidente de l'Université Paul Sabatier
Madame Régine ANDRE-OBRECHT

La Présidente de l'Université Paul Sabatier,
par délégation,
Le Vice-Président de la CFVU

Richard GUILLET

M. Arnaud FARRE
a été admis(e) sur concours en : 2014
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 18/07/2018
a validé son année d'approfondissement le 30/10/2019
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.



Toulouse, le 13 décembre 2019

Nom : FARRÉ

Prénom : Arnaud

Titre : Guide de bonnes pratiques pour les prélèvements biologiques sur la faune sauvage

Résumé : Les prélèvements *post-mortem* sur les animaux de la faune sauvage sont généralement pratiqués au cours de l'autopsie de ces derniers. Ils présentent plusieurs intérêts, notamment dans le domaine de l'épidémiosurveillance, dans un contexte où de nombreuses maladies émergentes ou ré-émergentes sont issues de la faune sauvage. Ils sont également très utilisés pour certaines études scientifiques sur la faune sauvage. Cette étude s'appuie sur de nombreux écrits ainsi que sur les propos de plusieurs vétérinaires experts de la faune sauvage. Elle a pour objectif de dégager des grands principes pour la bonne réalisation des prélèvements *post-mortem* sur les animaux de la faune sauvage. Elle s'intéresse tout d'abord aux différents acteurs qui réalisent ces prélèvements ainsi qu'à leurs buts. Ensuite, sont décrits les grands types de prélèvements ainsi que leurs conditions de réalisation : prélèvements bactériologiques, virologiques, fongiques, histologiques, toxicologiques, génétiques, parasitologiques, cytologiques, sanguins... La réalisation de ces prélèvements est à adapter selon l'état de fraîcheur et de conservation du cadavre. Par ailleurs, les membres de l'équipe de prélèvement doivent être préparés en amont de la venue sur le terrain. Ils doivent être en mesure de prendre la décision d'effectuer les prélèvements en laboratoire ou sur place. Les conditions d'hygiène et de sécurité sont très importantes pour éviter la transmission de maladies potentiellement zoonotiques. Enfin, une fois réalisés, les prélèvements doivent être conservés et transportés de manière adéquate jusqu'aux différents laboratoires d'analyses. C'est uniquement en respectant ces différents paramètres que les analyses issues de ces prélèvements peuvent s'avérer intéressantes.

Mots-clefs : prélèvement *post-mortem*, faune sauvage, épidémiosurveillance, diagnostic, autopsie

Title: Guidelines for biological post-mortem sampling of wildlife

Abstract: Post-mortem sampling of wild animals is usually performed during the necropsy and have many interests, especially in epidemiological surveillance, in the framework of emerging or re-emerging diseases from wildlife. Post-mortem samples are also widely used in scientific studies of wildlife. This study is based on numerous writings as well as the comments of several wildlife specialists' veterinarians. Its purpose is to establish broad principles for the proper execution of post-mortem sampling in wild animals. First, stakeholders involved in wildlife necropsy are presented. The main types of sampling and the conditions under which they are performed are then described. These samples include bacteriological, virologic, fungal, histological, toxicological, genetic, parasitological, cytological and blood samples... Post-mortem sampling in wildlife must be adjusted according to the state of freshness and conservation of the corpse. In addition, members of the team involved in sampling must be prepared ahead of time when they arrive in the field. They must be able to make the decision to perform samples on site or in the laboratory. Hygienic and safety conditions are very important to avoid the transmission of potentially zoonotic diseases. Finally, once sampled, specimen must be stored and transferred appropriately to the laboratories. It is only by respecting these different parameters that analyses resulting from these sampling have good diagnostic value.

Key Words: post-mortem sampling, wildlife, epidemiological surveillance, diagnostic, necropsy