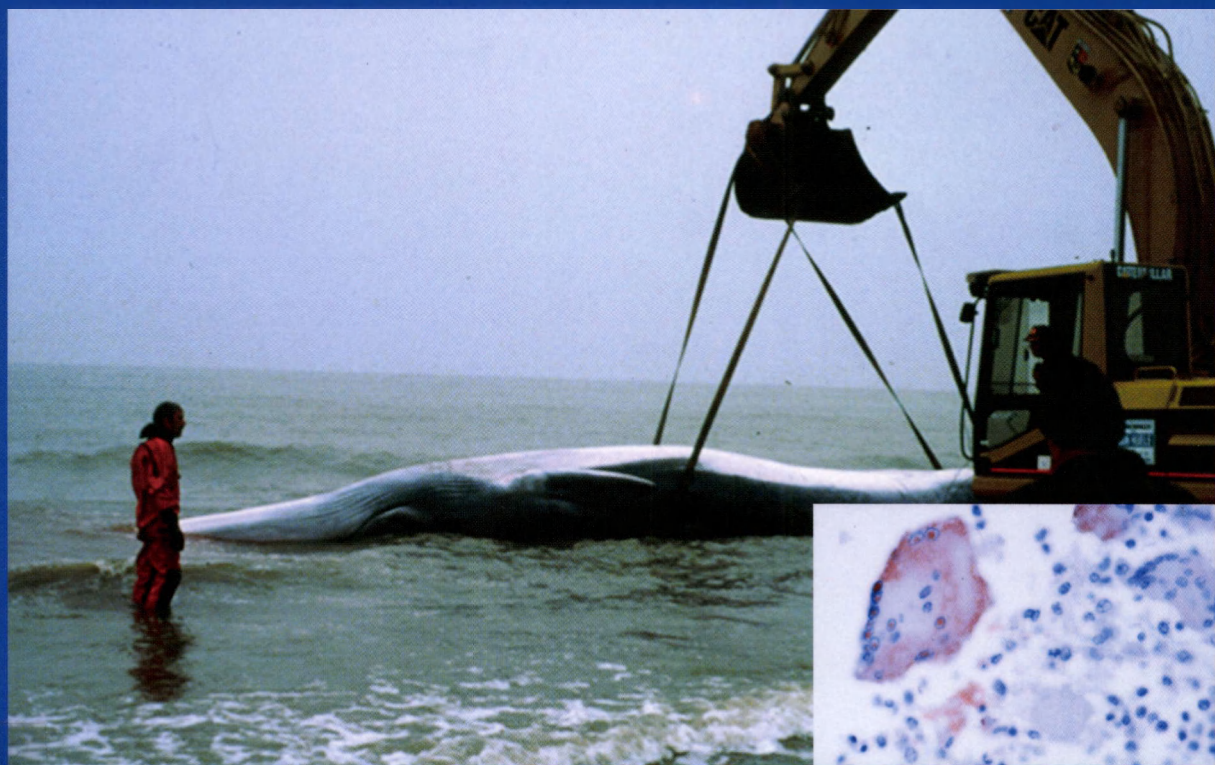




Université de Liège
Faculté de Médecine Vétérinaire
Service de Pathologie Générale

**Causes de mortalité des mammifères marins
sur les côtes continentales de la baie sud
de la Mer du Nord**

*Causes of marine mammals death on continental
coastlines of the southern North Sea*



Thierry JAUNIAUX

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade
de Docteur en Sciences Vétérinaires

Année académique 2001 - 2002



Université de Liège
Faculté de Médecine Vétérinaire
Service de Pathologie Générale

**CAUSES DE MORTALITÉ DES MAMMIFÈRES MARINS
SUR LES CÔTES CONTINENTALES DE LA BAIE SUD
DE LA MER DU NORD**

*Causes of marine mammals death on continental
coastlines of the southern North Sea*

Thierry JAUNIAUX

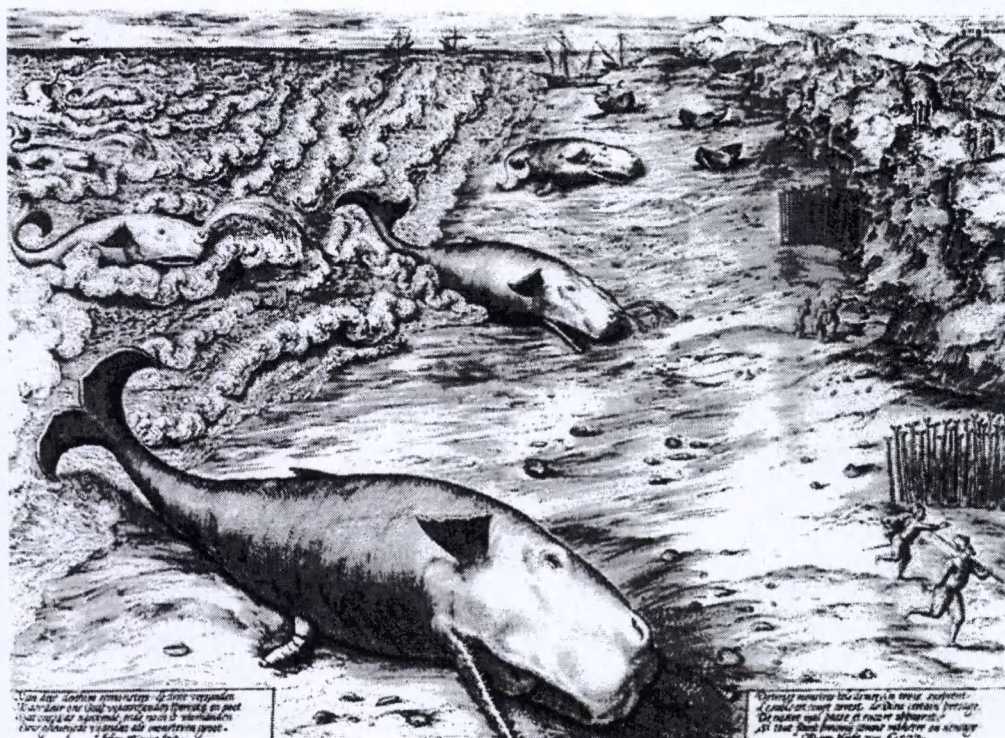
Thèse présentée en vue de l'obtention du grade
de Docteur en Sciences Vétérinaires

Année académique 2001 - 2002

A notre fils Maxime

« ... cet animal appartenait à l'embranchement des vertébrés, à la classe des mammifères, au groupe des pisciformes, et finalement à l'ordre des cétacés. Quant à la famille dans laquelle il prenait rang, baleine, cachalot ou dauphin, quant au genre dont il faisait partie, quant à l'espèce dans laquelle il convenait de le ranger, c'était une question à élucider ultérieurement. Pour la résoudre, il fallait disséquer ce monstre inconnu, ... »

Jules Verne, *Vingt mille lieues sous les mers*



Echouage massif de cachalots à proximité de Ter Heijde, Pays-Bas, en novembre 1577. Gravure de Johan Wierics, collection du Musée National d'Histoire Naturelle, Leiden.

Couverture : Rorqual commun échoué le 1^{er} novembre 1997 à Raversijde -Belgique- (Photo UGMM) :

Insert : Cellule syncytiale, démonstration immunohistochimique de l'hémagglutinine de PDV

A l'issue de la rédaction de cette thèse restait la partie la plus difficile à exprimer et à rédiger, à savoir les remerciements. De nombreuses personnes figurent sur cette liste que j'espère exhaustive. Sa longueur reflète sans doute l'aspect multidisciplinaire du projet mais aussi le soutien que tous m'ont apporté.

Je commencerai par le Professeur Coignoul qui m'a accueilli au service de Pathologie dès 1991 et qui, depuis lors, a continué à garder confiance dans le travail réalisé. Il a cru en l'aspect original de s'intéresser à la pathologie des mammifères marins échoués, en ma persévérance et je lui en suis très reconnaissant. Je tiens également à le remercier pour le soutien qu'il a apporté au Céto-club lors de sa création en 1989 et de ses premières années d'existence, permettant ainsi à de très nombreux étudiants d'approcher un peu plus un domaine qui les passionnait.

I would like to acknowledge Professor Kennedy who accepted to be co-promotor of my PhD, for all discussions, useful comments and advice.

Je remercie également le Professeur Thiry pour avoir accepté, malgré un emploi du temps chargé, de faire partie du comité de thèse, ainsi que pour ses conseils avisés.

Je voudrais également associer à ces remerciements toutes les personnes qui par leur enthousiasme, leur collaboration, leur assiduité et leur travail ont permis la création et la continuité du groupe MARIN et plus particulièrement :

Haelters J., Jacques T. (Département « Unité de gestion du modèle mathématique de la Mer du Nord et de l'estuaire de l'Escaut ») et Tavernier J. (Département « Education et nature ») de l'Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique ;

le Professeur Bouquegneau J.-M., Das K. et Debacker V. du laboratoire d'Océanologie de l'Université de Liège ;

Holsbeek L. et le Professeur Joiris C. de la Vrije Universiteit Brussel ;

Meire P., Offringa H., Seys J., Stienen E. et Van Wayenberg de l'Instituut voor Natuurbehoud (Bruxelles) ;

Van Gompel J. et toute l'équipe du National Sea Life Blankenberge.

Je voudrais exprimer ma gratitude à la Protection Civile (Liedekerke et Jabbeke) qui a assuré le support logistique de certaines opérations, souvent réalisées dans des conditions difficiles.

Ce réseau a pu s'étendre géographiquement grâce à la confiance de collaborateurs étrangers que je tiens à remercier :

Pour la France : Daubin W., Deval I., Ridoux V., Spitz J. et Van Canneyt O. du Centre de Recherche sur les Mammifères Marins (La Rochelle) qui, grâce à l'appui de leurs correspondants locaux et plus particulièrement Charpentier J.-M., Jakubek M, Karpouzopoulos J., Kiszka J., Lastavel A. et Thiery P., m'ont permis l'accès aux animaux échoués sur la côte française, de Dunkerque au Havre, et même plus loin, comme lors des autopsies d'un dauphin bi-céphale à Marseille et de 3 cachalots sur les côtes landaises.

Pour les Pays-Bas: Addink M. et Smeenk C. du Naturalis (Leiden) qui m'ont confié de très nombreuses autopsies, comme les trois cachalots de Scheveningen et qui m'ont également donné l'accès à leurs données historiques d'échouage. *Hartelijk dank*

Mes remerciements sont également adressés à tous les étudiants du Céto-club qui n'ont jamais hésité à m'aider pour réaliser les autopsies, que ce soit à la Faculté ou sur les plages et ce, malgré le hasard qui fait que les échouages se déroulent souvent le vendredi soir, le samedi ou le dimanche. Ce groupe d'étudiants a été créé le 13 février 1989 (le jour de l'échouage d'un cachalot qui se devait de s'appeler Valentin) par Castaigne J.-L. et moi-même. Je profite de l'occasion pour le remercier de toutes ces soirées de discussion, de son amitié et du soutien qu'il m'a apporté au fil de ces années. Allée K., Boseret G., Brenez C. et Petitjean D. se sont associés à ce projet en réalisant un stage de recherche ou un mémoire dans le domaine de la pathologie des mammifères marins. Qu'ils trouvent ici l'expression de mes remerciements pour leur enthousiasme et l'aide qu'ils m'ont apportée.

Je souhaite aussi exprimer ma gratitude aux membres du service de Pathologie. Merci pour leur soutien, leur disponibilité et le relais vis-à-vis des T.P., des lectures de lames et de la salle d'autopsie à Dominique, Cédric, Fatima, Daniel, Eric et Denis. Ces deux derniers n'ont d'ailleurs pas hésité à sacrifier un week-end pour "découper" les cachalots échoués à Coxyde en novembre 1994. Je voudrais remercier également Carine et Lucie pour toutes leurs marques d'attention et l'aide apportée lors de la rédaction finale de ce manuscrit, ainsi que Johnny, Michael et Michel qui, malgré parfois l'aspect "repoussant" de certains mammifères marins et des prélèvements, ont toujours tout organisé pour que les transports, les autopsies et les examens histopathologiques se déroulent dans les meilleures conditions. Merci aussi à Joël, Greg et Etienne pour les conseils et les très nombreuses discussions sur les RT-PCR, qu'il s'agisse de protocoles ou de "propreté de la paillasse", ainsi que pour ces quelques bières qui clôturaient souvent tardivement certaines journées. Je ne voudrais pas oublier les personnes qui ont quitté le service mais qui, chacun à leur manière, ont contribué à l'aboutissement du travail : Maryline qui a réalisé les premières autopsies, Laurence qui a initié l'identification des parasites et Andrée qui a contribué aux examens immunohistochimiques.

De très nombreux membres de la Faculté de Médecine Vétérinaire sont également intervenus et je voudrais les remercier du temps qu'ils m'ont consacré : Bradfer J.-F., Farnir

F., Gianfreda H., les Professeurs Losson B. et Mainil J., Lechanteur M.-E., Linden A., Manteca C., Poncelet D. et Trolin A.

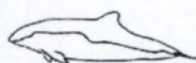
Certaines analyses n'ont pu être réalisées que grâce à Charlier G., Desmecht M., Desmecht, M.P., Godfroid J. et Verdebout F. du Centre d'Etude et de Recherche Vétérinaire et Agrochimique de Bruxelles ainsi que de Czaplicki G. du Centre de Prévention et de Guidance Vétérinaire de Loncin. Qu'ils trouvent ici l'expression de mes remerciements. De même, je voudrais remercier Domingo M. et Trudgett A. pour l'aide apportée à la réalisation des examens immunohistochimiques.

Je m'en voudrais de ne pas saisir l'opportunité d'associer Hanzen C. à ces remerciements, qui lors de grands joggings ou de longues soirées, m'a toujours soutenu et encouragé dans l'accomplissement de ce travail.

Thank you to García Hartmann M. for your encouragements and all profitable discussions, usually late in the evening, concerning pathology, marine mammals or beers.

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide financière des programmes " Impulsion en Sciences Marines " et " Gestion durable de la Mer du Nord " pour le compte de l'Etat belge, Service du Premier Ministre, Services fédéraux des affaires scientifiques, techniques et culturelles. Au départ, ce projet a également été financé par l'Union Européenne, ainsi que par l'Unité de Gestion du Modèle Mathématique de la Mer du Nord. Que toutes ces institutions trouvent ici l'expression de ma gratitude pour le support financier qu'elles ont apporté à ce projet.

Ce dernier paragraphe pour remercier ma famille et ma belle-famille qui m'ont permis l'épanouissement nécessaire pour aboutir à réaliser cette double passion : devenir vétérinaire et m'occuper de mammifères marins. Ces dernières lignes sont destinées à Sandrine et à Maxime qui depuis (trop) longtemps ont supporté ce long périple avec ses joies et ses sacrifices, avec mes absences et mon manque de disponibilité. Merci pour votre soutien et votre présence.



Liste des abréviations et des noms scientifiques d'espèces

BaP	Benzo[a]pyrène
Béluga	<i>Delphinapterus leucas</i>
Cachalot	<i>Physeter macrocephalus</i>
Cachalot pygmée	<i>Kogia breviceps</i>
CDV	<i>Canine distemper virus</i>
CMV	<i>Cetacean morbillivirus</i>
Dauphin bleu-blanc	<i>Stenella coeruleoalba</i>
Dauphin commun	<i>Delphinus delphis</i>
Dauphin de Bornéo	<i>Lagenodelphis hosei</i>
Dauphin de Gill	<i>Lagenorhynchus obliquidens</i>
Dauphin de Risso	<i>Grampus griseus</i>
Dauphin du Cap	<i>Delphinus capensis</i>
Dauphin tacheté de l'Atlantique	<i>Stenella frontalis</i>
DMV	<i>Dolphin morbillivirus</i>
Globicéphale nain	<i>Feresa attenuata</i>
Globicéphale noir	<i>Globicephala melas</i>
Globicéphale tropical	<i>Globicephala macrorhynchus</i>
Grand dauphin	<i>Tursiops truncatus</i>
Hyperodon boréal	<i>Hyperdoon ampullatus</i>
Lagénorhynque à bec blanc	<i>Lagenorhynchus albirostris</i>
Lagénorhynque à flancs blancs	<i>Lagenorhynchus acutus</i>
Lagénorhynque obscur	<i>Lagenorhynchus obscurus</i>
Lamantin	<i>Trichetus manatus latirostris</i>
Lion de mer de Californie	<i>Zalophus californianus</i>
MARIN	<i>Marine Animals Research & Intervention Network</i>
Marsouin commun	<i>Phocoena phocoena</i>
Narval	<i>Monodon monoceros</i>
pb	Paires de base
PCBs	Polychlorobiphényles
PDV	<i>Phocine distemper virus</i>
Petit rorqual	<i>Balaenoptera acutorostrata</i>

PhHV	<i>Phocid herpesvirus</i>
Phoque à capuchon	<i>Cystophora cristata</i>
Phoque Baïkal	<i>Phoca sibirica</i>
Phoque commun	<i>Phoca vitulina</i>
Phoque crabier	<i>Lobodon carcinophagus</i>
Phoque de la Caspienne	<i>Phoca caspica</i>
Phoque du Groenland	<i>Phoca groenlandica</i>
Phoque gris	<i>Halichoerus grypus</i>
Phoque léopard	<i>Hydrurga leptonyx</i>
Phoque marbré	<i>Phoca hispida</i>
Phoque moine de Méditerranée	<i>Monachus monachus</i>
PMV	<i>Porpoise morbillivirus</i>
PPRV	<i>Peste-des-petits-ruminants virus</i>
Pseudo-orque	<i>Pseudorca crassidens</i>
PWMV	<i>Pilot whale morbillivirus</i>
Rorqual commun	<i>Balaenoptera physalus</i>
RPV	<i>Rinderpest virus</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>

TABLE DE MATIERES

1. INTRODUCTION	11
1.1. PRÉLIMINAIRE.....	11
1.2. LES MAMMIFÈRES MARINS.....	13
1.3. CADRES LÉGAL ET POLITIQUE.....	14
1.4. ECHOUAGE ET AUTOPSIE DES MAMMIFÈRES MARINS	16
1.4.1. <i>Buts de l'autopsie</i>	16
1.4.2. <i>Bioindicateurs</i>	17
1.5. PRINCIPALES CAUSES DE MORTALITÉ DES MAMMIFÈRES MARINS.....	18
1.5.1. <i>Capture dans les filets (By-catch)</i>	18
1.5.1.1. Capture de mammifères marins dans les engins de pêche.....	18
1.5.1.2. Evidences de capture dans les filets et diagnostic.....	21
1.5.1.3. Cause de la mort.....	22
1.5.1.4. Mesures de réduction des captures de mammifères marins.....	22
1.5.2. <i>Infections virales</i>	23
1.5.2.1. Morbillivirus.....	23
1.5.2.2. Autres virus	36
1.5.3. <i>Infestations parasitaires</i>	37
1.5.3.1. Petits cétacés	37
1.5.3.2. Pinnipèdes	38
1.5.3.3. Grands cétacés.....	39
1.5.4. <i>Infections bactériennes</i>	39
1.5.4.1. Septicémie	39
1.5.4.2. Broncho-pneumonie	40
1.5.4.3. Brucellose.....	40
1.5.5. <i>Toxiques</i>	41
1.5.5.1. Immunodépression et sensibilité aux maladies infectieuses.....	42
1.5.5.2. Altérations de la reproduction et disrupteurs endocriniens.....	44
1.5.5.3. Induction de tumeurs.....	44
2. OBJECTIF ET PLAN DU TRAVAIL	47
3. PRÉSENTATION SYNOPTIQUE DES ÉTUDES	49

3.1.	LÉSIONS ET CAUSES DE MORTALITÉ DES MARSOUINS ÉCHOUÉS SUR LES CÔTES BELGE ET DU NORD DE LA FRANCE ENTRE 1990 ET 2000.....	49
3.2.	INFECTION PAR UN MORBILLIVIRUS CHEZ LES PHOQUES COMMUNS ÉCHOUÉS SUR LE LITTORAL BELGE ET DU NORD DE LA FRANCE DURANT L'ÉTÉ 1998	53
3.3.	LÉSIONS ET CAUSES DE MORTALITÉ DES PHOQUES ÉCHOUÉS SUR LE LITTORAL BELGE ET DU NORD DE LA FRANCE ENTRE 1990 ET 2000.....	55
3.4.	INVESTIGATIONS <i>POST MORTEM</i> RÉALISÉES SUR LES CACHALOTS ÉCHOUÉS SUR LE LITTORAL BELGE ET HOLLANDAIS.....	60
3.5.	LÉSIONS OBSERVÉES CHEZ DEUX RORQUALS (<i>BALAENOPTERA PHYSALUS</i>) ASSOCIÉES À UNE INFECTION PAR UN MORBILLIVIRUS.....	62
4.	DISCUSSION GÉNÉRALE.....	64
4.1.	PETITS CÉTACÉS.....	64
4.1.1.	<i>Lésions et observations post mortem.....</i>	64
4.1.1.1.	Emaciation.....	64
4.1.1.2.	Broncho-pneumonie	65
4.1.1.3.	Infestations parasitaires.....	66
4.1.1.4.	Capture dans les filets.....	67
4.1.1.5.	Morbillivirose	67
4.1.2.	<i>Analyses toxicologiques.....</i>	68
4.1.3.	<i>Causes de la mort et impact des activités humaines.....</i>	68
4.2.	PINNIPÈDES	70
4.2.1.	<i>Lésions et observations post mortem.....</i>	70
4.2.1.1.	Emaciation.....	71
4.2.1.2.	Processus morbide aigu.....	71
4.2.1.3.	Processus morbide chronique.....	72
4.2.2.	<i>Analyses toxicologiques.....</i>	75
4.2.3.	<i>Causes de la mort et impact des activités humaines.....</i>	75
4.3.	GRANDS CÉTACÉS.....	77
4.3.1.	<i>Echouage massif.....</i>	77
4.3.2.	<i>Hypothèse d'échouage des cachalots.....</i>	79
4.3.3.	<i>Morbillivirose.....</i>	81
4.3.4.	<i>Analyses toxicologiques.....</i>	82
4.3.5.	<i>Causes de la mort et impact des activités humaines.....</i>	82

5. CONCLUSIONS.....	84
6. PERSPECTIVES.....	87
7. RÉSUMÉ.....	89
8. SUMMARY.....	93
9. BIBLIOGRAPHIE.....	97
10. PRÉSENTATION SYSTÉMATIQUE DES ÉTUDES.....	115
10.1. ETUDE 1 : POSTMORTEM FINDINGS AND CAUSES OF DEATH OF HARBOUR PORPOISES (<i>PHOCOENA PHOCOENA</i>) STRANDED FROM 1990 TO 2000 ALONG THE COASTLINES OF BELGIUM AND NORTHERN FRANCE..	116
10.2. ETUDE 2 : MORBILLIVIRUS IN COMMON SEALS STRANDED ON THE COASTS OF BELGIUM AND NORTHERN FRANCE DURING SUMMER 1998	137
10.3. ETUDE 3 : LESIONS AND CAUSES OF DEATH OF SEALS STRANDED ON THE COASTS OF BELGIUM AND NORTHERN FRANCE FROM 1990 TO 2000.....	151
10.4. ETUDE 4 : POSTMORTEM INVESTIGATIONS ON WINTER STRANDED SPERM WHALES FROM THE COASTS OF BELGIUM AND THE NETHERLANDS	168
10.5. ETUDE 5 : PATHOLOGICAL FINDINGS IN TWO FIN WHALES (<i>BALAENOPTERA PHYSALUS</i>) WITH EVIDENCE OF MORBILLIVIRUS INFECTION.....	185

1. INTRODUCTION

1.1. Préliminaire

Depuis 1990, le service de Pathologie Générale de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège (ULg) est associé à un programme de recherche, dont les buts, sont de déterminer les principales lésions et causes de mortalité des oiseaux et des mammifères marins échoués le long de notre côte. Ce programme multidisciplinaire, associe également des biologistes et des toxicologues, le principe fondateur du projet étant de mettre en rapport les observations relevées lors de l'autopsie avec les taux des principaux toxiques détectés dans les tissus des animaux échoués.

A partir de 1995, le réseau d'intervention MARIN (*Marine Animals Research & Intervention Network* Figure 1) a été associé à la gestion des échouages et des autopsies des mammifères marins retrouvés vivants ou morts en mer et sur la section de côte s'étendant de l'estuaire de l'Escaut (Pays-Bas) à la baie de la Somme (France). Depuis janvier 2001, le réseau s'est déployé en France jusqu'au Havre. L'organisation générale du réseau est illustrée à la figure 1.

Les animaux échoués sont collectés par des collaborateurs de l'Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique ainsi que par des correspondants du Centre de Recherche sur les Mammifères Marins de la Rochelle (France). Les animaux échoués vivants sont transmis dans les centres de réhabilitation (*National Sea Life Blankenberge ; Harderwijk Marine Mammals Park*, Pays-Bas). Les animaux morts sont autopsiés au service de Pathologie Générale de la Faculté de Médecine Vétérinaire (ULg) et les analyses de contaminants¹ dans les tissus sont réalisées au laboratoire d'Océanologie (ULg) -métaux lourds- ainsi qu'au laboratoire

¹ Contaminant : substance potentiellement polluante soit étrangère introduite artificiellement dans un biotope terrestre ou aquatique soit encore naturellement présente dans un écosystème mais dont les concentrations sont anormalement accrues par l'action de l'homme, avec pour conséquence dans un cas comme dans l'autre sa bioaccumulation dans les êtres vivants (Ramade, 2000).

d'Ecotoxicologie et de Biologie Polaire de la *Vrije Universiteit van Brussel* -PCBs et pesticides-. La coordination administrative est assurée par l'Unité de Gestion du Modèle Mathématique de la Mer du Nord.

Le groupe MARIN, par son aspect multidisciplinaire, son analyse temporelle étendue et sa large couverture géographique représente un outil essentiel à la compréhension des causes de mortalité et d'échouage des mammifères marins dans la baie sud de la Mer du Nord.

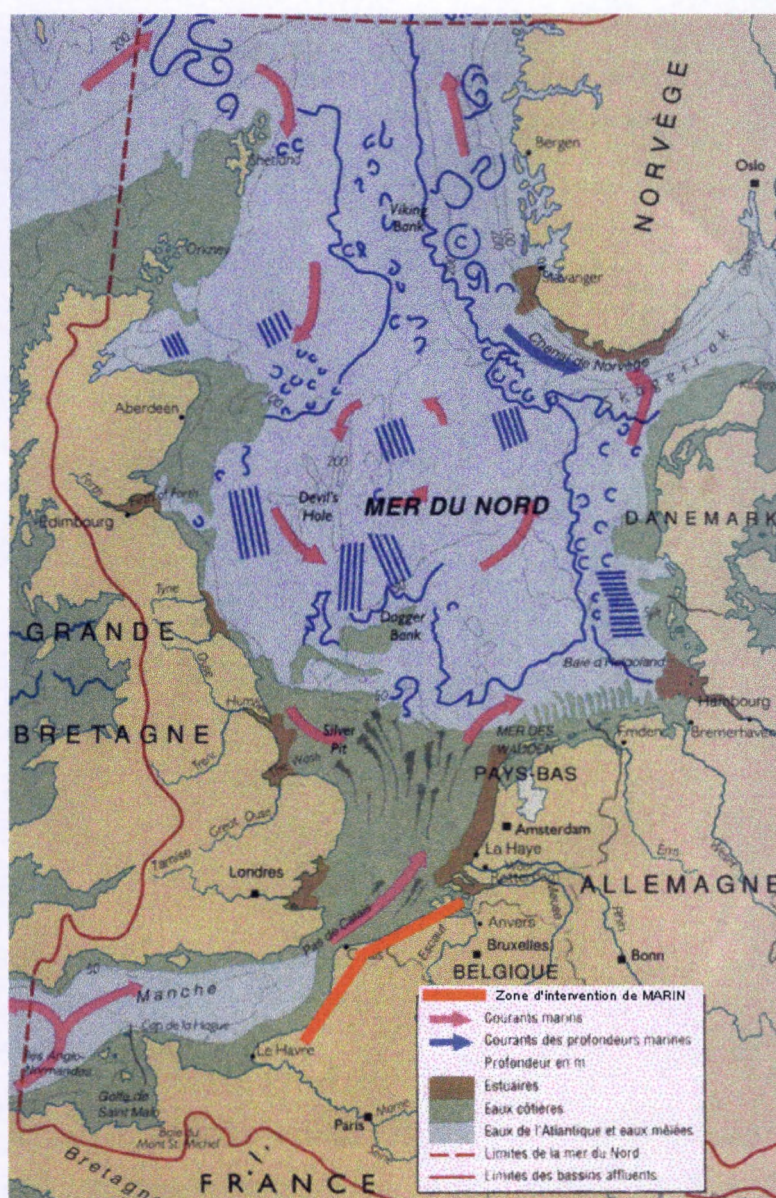
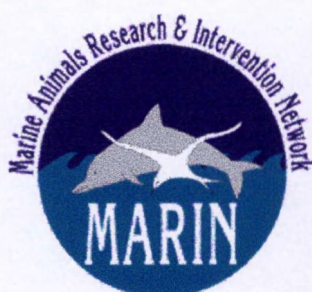


Figure 1 : Carte de la Mer du Nord et de la zone d'intervention du groupe MARIN

Ce programme a initialement été financé par l'Unité de Gestion Mathématique de la Mer du Nord et la Communauté Européenne. Depuis 1992, le financement de MARIN est assuré par les Services des Affaires Scientifiques, Techniques et Culturelles dépendant du Premier Ministre. Cette convention s'inscrit dans le cadre du plan d'appui scientifique à une politique de développement durable, et plus particulièrement, la gestion durable de la Mer du Nord, et s'est achevée fin décembre 2001.

1.2. Les mammifères marins

Depuis toujours, les mammifères marins ont fasciné. Ainsi, la baleine est le premier animal cité par la Bible, dans la Genèse : “ Et Dieu créa les baleines et toutes les créatures vivantes ” . Fait remarquable, dans son *Histoire des Animaux*, Aristote (384-322 av. J.-C.) range les dauphins, les orques et les cachalots parmi les mammifères, faisant clairement une distinction entre les poissons et les cétacés. Auparavant, mais aussi par la suite, ils étaient considérés comme des “ Léviathans ” à côté des requins et des crocodiles (Brown, 1999). Pline l'Ancien (23-79), dans ses *Histoires Naturelles*, inspirées des travaux d'Aristote, agrémentera d'observations originales autant que de notations fantaisistes, les informations concernant ces animaux marins. Il faudra néanmoins attendre la Renaissance pour que les connaissances s'épanouissent. Conrad Gessner à Zürich (*Historae animalium*, 1551-1587) et Ambroise Paré à Paris (*Des monstres tant terrestres que marins*, 1573) décrivent et distinguent les baleines et s'attardent sur les méthodes de chasse. Néanmoins, en 1753, Daubenton considérait encore les cétacés comme des poissons. Il faudra attendre la 10^e édition du *Systema Naturae* (1758) de Linné pour voir ces animaux définitivement classés parmi les mammifères. Dès le XIX^e siècle, l'observation et la classification des cétacés deviendront une réelle priorité. Ainsi, un des plus grands cétologues de la seconde moitié du XIX^e siècle fût le belge P.-J. Van Beneden qui a publié entre 1857 et 1889 plus de 40 articles et ouvrages sur les mammifères marins, dont le célèbre “*Histoire naturelle des Delphinidés des mers d'Europe*” en 1889.

Si la relation de l'Homme à ces espèces se perd dans la nuit des temps, la nature de cette relation a aussi évolué. Ainsi, ces animaux, considérés comme mythiques par certains, ont depuis toujours inspiré les poètes et les artistes et ont été, depuis la Baleine de Jonas jusqu'à Flipper le Dauphin, à l'origine de légendes et d'histoires. Le mythe de Jonas, avalé et rejeté par une baleine, est assimilable à une descente aux Enfers, suivie d'une résurrection, ou un site d'initiation (Cabard et Chauvet, 1998). Loin de ces interprétations allégoriques, ces animaux ont été estimés en fonction de leur valeur marchande, comme une source importante de revenus par l'intermédiaire de la chasse. En effet, dès l'âge de la pierre, les baleines furent chassées par les Basques, mais la chasse devient organisée qu'au neuvième siècle. Cette chasse s'intensifie au

XIXe siècle et apparait la première cause sévère de mortalité des baleines en 1868, avec l'invention du canon harpon par Sven Foyd. Néanmoins, la Commission Baleinière Internationale, fondée en 1946, a établi en 1982 un moratoire interdisant la chasse commerciale de grands cétacés (@²). Depuis, avec l'arrivée des concepts écologistes, ces animaux sont devenus pour certains, des symboles de liberté et de paix. Loin de ces considérations herméneutiques, ils sont progressivement devenus des bioindicateurs³, où la relation entre ces espèces et l'Homme prend l'aspect d'une surveillance de l'impact des activités humaines sur l'environnement. Ainsi, ces animaux en sommet de chaîne alimentaire et à longue durée de vie sont devenus des espèces sentinelles permettant d'estimer et de prévoir les altérations éventuelles engendrées par la pollution anthropique marine.

Trois ordres principaux sont reconnus parmi les mammifères marins : les cétacés, les pinnipèdes et les siréniens. Au sein de ceux-ci, seuls les cétacés et les pinnipèdes fréquentent les eaux de la Mer du Nord. Parmi les petits cétacés, les espèces les plus fréquemment observées dans la baie sud de la Mer du Nord sont le marsouin commun, le lagénorhynque à bec blanc, le lagénorhynque à flancs blancs et le dauphin bleu-blanc. Parmi les grands cétacés, le petit rorqual est régulièrement présent, tandis que le cachalot et le rorqual commun sont des hôtes occasionnels. Parmi les pinnipèdes, seuls le phoque commun et le phoque gris s'observent régulièrement le long de notre littoral.

1.3. Cadres légal et politique

Plusieurs accords internationaux existent en matière de conservation et de protection des mammifères marins en Mer du Nord. La plupart des pays limitrophes de cette mer, y compris la Belgique, ont ratifié trois accords internationaux, à savoir la directive européenne "Habitat – Natura 2000" sur la conservation des habitats naturels, de la flore et de la faune sauvage ; les conférences internationales de la Mer du Nord et la convention de Bonn par l'intermédiaire du traité d'ASCOBANS (Jacques, 1997).

- La directive "Habitat – Natura 2000" (21 mai 1992) dans son annexe IV, requiert une protection stricte et encourage les recherches scientifiques nécessaires afin d'assurer la conservation de tous les cétacés. De plus, le grand dauphin, le

@² <http://ourworld.compuserve.com/homepages/iwcoffice/>

³ Bioindicateur : terme synonyme d'indicateurs biologiques, désignant des espèces végétales ou animales (= organismes sentinelles) qui, par suite de leurs particularités écologiques, sont l'indice précoce de modifications abiotiques ou biotiques de l'environnement dues à tel ou tel type d'action humaine (Ramade, 2000).

marsouin commun, le phoque gris et le phoque commun sont placés dans l'annexe II prévoyant la création de réserve marines pour ces espèces.

- Un “ mémorandum d'entente sur les petits cétacés de la Mer du Nord ” émane de la troisième conférence internationale sur la protection de la Mer du Nord (La Haye, 8 mars 1990). Une des bases de ce mémorandum postule que “...la pollution marine, les captures accidentelles et la détérioration de l'habitat peuvent menacer l'état de ces populations [de cétacés]”. En conséquence, les pays signataires doivent appliquer diverses mesures de gestion et de protection, ainsi que la coordination des recherches sur les causes de morbidité et de mortalité, ainsi que l'analyse des contaminants (@⁴). De plus, l'annexe 5 de cette déclaration précise que des études doivent être initiées dans le domaine des pathologies et des contaminants présents chez les phoques incluant le suivi de l'épizootie à morbillivirus. Il est également précisé qu'il faut créer un registre international collectant toutes les informations relatives aux échouages de mammifères marins comprenant les résultats nécropsiques, toxicologiques, etc. Néanmoins, nulle part ne figure une obligation de moyens à mettre en oeuvre pour l'application de ces mesures. La 4^e conférence à Esbjerg (1995) met l'accent sur l'impact des captures accidentelles de mammifères marins, préconisant la mise en place de méthodes de réduction de leur capture (@⁵).
- Le traité ASCOBANS (Accord sur la conservation des petits cétacés de la Mer Baltique et de la Mer du Nord @⁶) vise à la conservation des petits cétacés en Mer du Nord et en Mer Baltique, en identifiant les principales menaces pesant sur ces espèces, recommandant l'autopsie de tous les individus échoués ainsi que la collecte d'échantillons à des fins scientifiques afin d'identifier les causes de mortalité. Dans ce cadre, l'accent est mis tout particulièrement sur les effets de la pollution ainsi que sur les interactions avec les pêcheries.

En ratifiant ces accords, les différents gouvernements se sont engagés à organiser une réponse scientifique à tout échouage et à assurer plus particulièrement une autopsie complète ainsi que les investigations pathologiques et toxicologiques nécessaires (Jacques, 1997). Pour la Belgique, c'est l'Unité des Modèles Mathématiques de la Mer du Nord qui est chargé de la centralisation de ces informations.

@⁴ <http://www.dep.no/md/html/conf/declaration/hague.html>

@⁵ <http://www.dep.no/md/html/conf/declaration/esbjerg.html>

@⁶ <http://www.ascobans.org/>

1.4. Echouage et autopsie des mammifères marins

Dans les années 80 et 90, l'émergence d'échouages de mammifères marins a été suspectée comme la conséquence de la dégradation de l'environnement marin (Geraci *et al.*, 1999). Cependant, ce phénomène n'est pas récent puisque dès le XVI^e siècle, des échouages de cachalots étaient rapportés en Mer du Nord (Smeenk, 1997). Qu'il s'agisse de petits cétacés, de phoques ou de grandes baleines, ces échouages ont toujours suscité la curiosité et l'intérêt du grand public, des médias et des scientifiques (Jacques, 1997; Noël, 1997). Ces derniers, lors de l'échouage, sont confrontés à la gestion de la situation sur la plage (Geraci et Lounsbury, 1993), de remettre l'animal en mer ou de l'envoyer dans un centre spécialisé si l'animal est vivant ; de l'autopsier sur place ou dans un laboratoire si l'animal est mort (Jacques, 1997). De ce point de vue, ces animaux sont une source cruciale d'informations qui doit être exploitée selon des méthodes et procédures rigoureuses. Afin d'optimiser les informations potentielles de l'animal échoué (García Hartmann, 1997; Coignoul et Jauniaux, 1997; Geraci *et al.*, 1999), des protocoles standardisés et exhaustifs ont été mis au point (Dierauf, 1990a; 1990b; 1994; Dierauf et Gage, 1990; Kuiken et García Hartmann, 1991; Geraci et Lounsbury, 1993; Jauniaux *et al.*, 1999).

La gestion d'un échouage varie selon la taille et le nombre d'individus. Autant la procédure est simple lorsqu'il s'agit d'un marsouin, autant la gestion technique, administrative et scientifique se complique lorsque quatre cachalots s'échouent en même temps (Tavernier, 1997; Jauniaux *et al.*, 1999).

1.4.1. Buts de l'autopsie

Peu d'informations sont disponibles sur les lésions des mammifères marins échoués, les quelques connaissances provenant d'animaux captifs ou des animaux capturés durant les activités de chasse. Le but immédiat de l'autopsie et des analyses complémentaires est de combler cette lacune par une meilleure connaissance de leurs pathologies permettant ainsi d'identifier les principales causes de mortalité (Coignoul et Jauniaux, 1997; Geraci *et al.*, 1999; Jauniaux *et al.*, 1999). De même, ces examens donnent l'occasion d'améliorer les informations relatives à leur biologie, anatomie, histologie, ... (Jacques, 1997). Finalement, ces autopsies permettent d'évaluer l'interaction et l'impact des activités humaines et reflètent la qualité de l'environnement dans lequel ces espèces évoluent (Jacques, 1997).

1.4.2. Bioindicateurs

Les mammifères marins accumulent durant toute leur vie des contaminants comme les métaux lourds et les organochlorés générées par les activités humaines, présents en quantités importantes en Mer du Nord. Des taux élevés de ces substances ont été détectés aussi bien chez les phoques que chez les cétacés, capturés dans les filets (Kleivane *et al.*, 1995) ou échoués sur les plages (Duinker *et al.*, 1989; Joiris *et al.*, 1991; Wells *et al.*, 1994). Sur la base de ces seules analyses toxicologiques, certains ont présagé un danger pour ces populations (Morris *et al.*, 1989; Law *et al.*, 1991). Néanmoins, jusqu'au début des années 90, ces analyses toxicologiques n'étaient pas réalisées simultanément avec une étude pathologique et l'impact sur la santé ne pouvait pas être établi (Reijnders *et al.*, 1999).

Les mammifères marins, par leur position en sommet de chaîne trophique, sont ainsi considérés comme étant des bioindicateurs, capables de révéler les altérations éventuelles que ces contaminants pourraient induire à long terme (Bowles, 1999; Busbee *et al.*, Mangel et Hofman, 1999; 1999; Siebert *et al.*, 1999). L'alimentation est la voie principale de contamination, mais d'autres existent comme les voies transcutanée, transplacentaire ou respiratoire (Aguilar *et al.*, 1999; Das *et al.*, 2001a). Les contaminants lipophiles se concentrent au travers de la chaîne alimentaire (Morris *et al.*, 1989; Aguilar *et al.*, 1999; Bowles, 1999) et la concentration tissulaire des animaux situés en sommet de réseaux trophiques est dès lors beaucoup plus élevée. Ce processus, appelé bioamplification, peut être défini comme étant le rapport de concentrations tissulaires en une substance donnée entre le prédateur et la proie (Aguilar *et al.*, 1999). Cette bioamplification varie selon les espèces et les contaminants. Ainsi, elle est élevée pour les organochlorés, certains PCBs et le mercure organique (Duinker *et al.*, 1989; Aguilar *et al.*, 1999; Bowles, 1999), ce rapport de concentration entre le prédateur et la proie pouvant atteindre des valeurs supérieures à 500 voire 1000 pour le DDT, la diéldrine et certains PCBs (Morris *et al.*, 1989). Les paramètres biologiques, comme l'âge, le sexe, les migrations sont également à l'origine de fluctuations des concentrations tissulaires en contaminants (Law *et al.*, 1997; Aguilar *et al.*, 1999; Jepson *et al.*, 1999; Siebert *et al.*, 1999; Das *et al.*, 2001a). Les femelles adultes éliminent une partie de ces substances lipophiles au moment de la gestation et de la lactation (lait riche en graisse), contaminant ainsi leur foetus avant la naissance (Wells *et al.*, 1994).

L'effet toxique est déterminé selon les quantités ingérées, les mécanismes de détoxification ou d'excrétion, les interactions avec les autres substances, ... (Bowles, 1999; Das *et al.*, 2001a), si bien qu'une concentration élevée en un contaminant n'est pas synonyme d'effets nosogènes. De plus, s'il existe des relations entre les concentrations tissulaires et l'état de santé de l'animal (Wells *et al.*, 1997; Aguilar *et al.*, 1999), la question est quelle est la nature de ce lien : soit les teneurs élevées en contaminants prédisposent aux maladies, soit les maladies en accroissent les concentrations tissulaires. Dès lors, comme signalé par Reijnders et collaborateurs (1999), seules les analyses combinées de pathologie et de toxicologie peuvent identifier des altérations liées à l'exposition aux contaminants présents dans l'écosystème marin.

1.5. Principales causes de mortalité des mammifères marins

Ce chapitre se concentre sur la zone géographique que constitue la baie sud de la Mer du Nord. La situation d'autres régions sera présentée lorsqu'elle apporte un intérêt dans la perception et la compréhension des processus morbides.

1.5.1. Capture dans les filets (By-catch)

1.5.1.1. Capture de mammifères marins dans les engins de pêche

L'Atlantique nord-est, y compris la Mer du Nord, est la seconde zone la plus productrice de poissons au monde, après le Pacifique nord-ouest (Northridge, 1985). L'importante activité de pêche qui en résulte est la source de nombreuses interactions avec les mammifères marins. Parmi celles-ci, la capture dans les filets représente l'effet le plus négatif (Northridge et Hofman, 1999), entraînant la mort de plusieurs milliers de pinnipèdes ou de cétacés chaque année (Northridge, 1985; 1992; Northridge et Hofman, 1999). On estime que certaines espèces sont en danger imminent d'extinction suite aux activités halieutiques (Northridge et Hofman, 1999).

En Mer du Nord, ces captures représentent une des premières causes de mortalité des petits cétacés (Baker, 1992b; Baker et Martin, 1992; Kuiken *et al.*, 1994a; Kirkwood *et al.*, 1997; Siebert *et al.*, 2001). Le marsouin est l'espèce la plus fréquemment capturée, le taux de capture annuel dépassant souvent 2 % voire 4 % de la population (Carlström et Bergren, 1999) par rapport à d'autres espèces comme le dauphin commun (Tregenza *et al.*, 1997). Une capacité plus faible de détection des filets serait à l'origine de cette situation (Kastelein et de Haan, 2000).

Pays	Zone de Pêche	Période	Estimation annuelle	Référence
Danemark	Mer du Nord	1993-1994	4629 (7000*)	Vinther, 1996
Danemark	Mer du Nord, Baltique	1994-1998	6785	Vinther, 1999
Grande-Bretagne	Mer d'Irlande	1993-1994	2200	Tregenza <i>et al.</i> , 1997
Suède	Skagerrak (Suède)	1996-1997	113	Carlström et Bergren, 1999
Grande-Bretagne	Mer du Nord	1995-1997	600-800	Anonymous, 2000
Grande-Bretagne	Mer du Nord	1998	462	Northridge, com. pers.

Tableau 1 : Estimation du nombre de marsouins capturés chaque année en Mer du Nord et dans les mers adjacentes. *: extrapolation à toutes les pêches danoises confondues

Selon la Commission Baleinière Internationale, pour le marsouin de l'Atlantique nord, la mortalité dans les filets dépasse les niveaux requis au maintien de la population. La population de marsouins est estimée à 352000 individus en Mer du Nord (267000 à 465000) (Hammond *et al.*, 1995) et le taux de croissance de la population est estimé à 2 %, voire 4 % dans les meilleurs cas de figure. A elles seules, les pêches danoises représentent un danger, leurs prises de marsouins (Tableau 1) dépassant 2 % du nombre estimé de marsouins présents dans la partie centrale et méridionale de la Mer du Nord (@⁷). En effet, il a été estimé que les pêcheurs danois ont capturé 7000 marsouins en Mer du Nord entre 1993 et 1994 (Vinther, 1996), et une moyenne annuelle de 6785 individus dans la période 1994-1998 (Vinther, 1999). Dans les eaux suédoises, les prises dans les filets ont été supérieures à 4 % de la population locale de marsouins entre mars 1996 et février 1997 (Carlström et Bergren, 1999). Il en est de même pour la Mer d'Irlande où 2200 marsouins auraient été capturés en 1993-1994, soit plus de 6 % de la population (Tregenza *et al.*, 1997). Sur les côtes anglaises de la Mer du Nord, c'est entre 600 et 800 marsouins qui ont été capturés chaque année entre 1995 et 1997 (Anonymous, 2000) et 462 en 1998 (Northridge, communication personnelle).

En parallèle à ces estimations, les autopsies systématiques des carcasses échouées sur les plages permettent aussi une évaluation de l'importance de la prise dans les filets. En effet, la plupart des pêcheurs rejettent les cadavres en mer, dont certains s'échouent en fonction des vents, des courants et des marées (Tregenza et Collet, 1998). La fréquence de capture estimée à partir des autopsies varie de manière importante selon les régions et les auteurs (Tableau 2). Le

@⁷ http://smub.st-and.ac.uk/ch4_2.html

long des côtes britanniques, 24 à 34 % des marsouins et plus de 60 % des dauphins communs échoués seraient morts dans des filets (Baker et Martin, 1992; Kirkwood *et al.*, 1997). Le long des côtes allemandes (Mers du Nord et Baltique), les taux varient autour de 50 % pour les marsouins (Benke *et al.*, 1998; Siebert *et al.*, 2001). Sur les côtes hollandaises, les taux sont de 10 à 20 % (Addink et Smeenk, 1999).

Espèce	Fréquence de capture	Localisation	Période	Référence
Marsouin	10/41	Iles britanniques	1989-1991	Baker & Martin, 1992
Dauphin commun	1/8	Iles britanniques	1989-1991	Baker, 1992
Dauphin bleu-blanc	2/4			
Dauphin commun	30/38*	Iles britanniques	1992	Kuiken <i>et al.</i> , 1994
Marsouin	66/234	Iles britanniques	1990-1995	Kirkwood, 1997
Dauphin commun	86/138			
Marsouin	31/61 **	Côtes allemandes (Mers du Nord et Baltique)	1991-1993	Benke, 1998
Marsouin	67/197	Iles britanniques	1990-1996	Jepson, 2000
Marsouin	62/133**	Côtes allemandes (Mers du Nord et Baltique)	1991-1996	Siebert <i>et al.</i> , 2001

Tableau 2 : Fréquence du diagnostic de capture dans des filets sur les petits cétacés échoués sur les côtes de la Mer du Nord ; Fréquence de capture : individus capturés/individus autopsiés.*: échouage collectif de 118 dauphins morts (hiver 1992) ; **: prime aux pêcheurs

Plusieurs raisons expliquent les variations dans ces taux de capture. Pour l'anecdote, le taux élevé rapporté sur les côtes allemandes est dû en partie au fait qu'une prime de 50 puis 75 DM (respectivement 25,56 et 38,35 €) était accordées à toute personne rapportant une carcasse, y compris les pêcheurs (Benke *et al.*, 1998; Siebert *et al.*, 2001). L'importance des activités halieutiques et les techniques de pêche influencent également les prises (Reijnders *et al.*, 1996).

Les captures de grands cétacés en Atlantique Nord-Est sont anecdotiques (Northridge, 1985), les quelques individus pris ayant pu être libérés (Northridge, 1992).

Les phoques (communs, gris et du Groenland) sont des victimes fréquentes des activités halieutiques, sans que pour autant ces captures représentent être une menace pour ces espèces en raison de la taille des populations (Northridge, 1985; Northridge, 1992).

1.5.1.2. Evidences de capture dans les filets et diagnostic

Différentes observations sont prises en compte pour établir un diagnostic de capture, certaines attestant de manière très probable la capture dans un filet telles que :

- Lésions de prise dans un filet : se caractérisent par la présence de lacérations cutanées, de fractures ou d'hématomes (Baker et Martin, 1992; Kuiken *et al.*, 1994b; Baker, 1996; Kirkwood *et al.*, 1997; Benke *et al.*, 1998; Siebert *et al.*, 2001).
- Lésions de libération du filet : amputation de membres ou éventration de la carcasse, les pêcheurs coupant les nageoires pour dégager les individus des filets ou incisant la cavité abdominale pour que la carcasse coule plus aisément (Kuiken *et al.*, 1994b; 1996b; Baker, 1996).

D'autres observations suggèrent la capture telles que :

- Bon état de santé : l'exclusion d'une autre cause de mortalité, un état nutritionnel adéquat (épaisseur de graisse suffisante) et l'évidence de repas récents (proies fraîches dans l'estomac, chyle dans les vaisseaux lymphatiques mésentériques) sont fréquemment présents.
- Lésions d'hypoxie : de la congestion, de l'oedème transsudat et de l'emphysème pulmonaires sont souvent rapportés, parfois accompagnés de pétéchies pleurales et épocardiques ainsi que d'hémorragies (Kuiken *et al.*, 1994b; Baker, 1996; Jepson *et al.*, 2000).

Néanmoins, individuellement, ces éléments ne sont pas pathognomoniques, d'autres processus pouvant en être à l'origine. De plus, ces lésions ne sont pas toujours présentes ou rapportées (van Nie, 1989; García Hartmann *et al.*, 1996; Siebert *et al.*, 2001). Pour ces raisons, d'autres méthodes ont été proposées, comme la présence d'eau de mer (Baker et Martin, 1992) et/ou d'organismes marins (Larsen et Holm, 1996) dans les voies respiratoires. Néanmoins, l'eau pouvant y pénétrer après la mort (Kuiken *et al.*, 1994b; Carlström et Bergren, 1999), aucune conclusion ne peut être tirée de cette observation. Pour Larsen et Holm (1996), la présence de diatomées (algues unicellulaires aquatiques) dans les voies respiratoires profondes serait également l'évidence d'une mort par noyade (Larsen et Holm, 1996). Cependant, de telles observations ne sont pas rapportées dans d'autres études (Kuiken, 1996b; Jepson *et al.*, 2000;

Siebert *et al.*, 2001) et la présence d'organismes marins dans les voies respiratoires pourrait être liée à des processus de régurgitation agonique comme observés chez certains cétacés (Birkun, 1996; Siebert *et al.*, 2001; Knieriem et García Hartmann, 2001).

Un accroissement inhabituel du nombre d'échouages peut également indiquer un grand nombre de capture. Ainsi, durant l'hiver 1992, 118 dauphins morts se sont échoués sur les côtes anglaises de la Manche, soit 18 fois plus que d'habitude et sur 38 individus autopsiés, 30 présentaient des évidences de capture (Kuiken *et al.*, 1994b). Fin février 1989, plus de 600 delphinidés se sont échoués en deux jours sur les côtes des Landes et de la Vendée tandis qu'en février 1997, plus de 660 dauphins ont été drossés sur les côtes françaises du Golfe de Gascogne. Dans les deux cas, il a été estimé qu'il s'agissait de captures accidentelles dans des engins de pêche (Tregenza et Collet, 1998).

Il est évident que les captures de marsouins sont sous-estimées en Mer du Nord et qu'elles ont un impact significatif sur la dynamique de leur population (Kinze, 1994; Siebert *et al.*, 2001).

1.5.1.3. Cause de la mort

Les mammifères terrestres, en phase agonique de noyage, inhalent de l'eau et les diatomées qu'elle contient suite au réflexe inspiratoire. Ces algues traversent la barrière alvéolo-capillaire et sont distribuées dans tous les organes par la circulation sanguine. En médecine légale humaine, la recherche et l'identification de ces algues dans les tissus (reins, cerveau, ...) des noyés permettent de confirmer une suspicion. Cette technique a été appliquée sur des reins de 19 lagénorhynques à flanc blanc capturés dans des filets et conservés par les pêcheurs. Dans aucun animal, des diatomées n'ont pu être isolées, suggérant que les animaux n'inhalent pas d'eau (Jauniaux *et al.*, 1997). La question de savoir si les cétacés capturés dans les filets meurent noyés ou asphyxiés n'est donc pas encore clairement résolue (Kuiken *et al.*, 1994b). En effet, certaines évidences suggèrent que de l'eau pourrait être inhalée en phase finale (Larsen et Holm, 1996) mais comme signalé ci-dessus, ces évidences sont soumises à controverse. De plus, la respiration est entièrement volontaire chez les cétacés, le réflexe inspiratoire étant absent ; il est vraisemblable qu'ils meurent de suffocation. Les examens *post mortem* semblent confirmer cette hypothèse. Dans un tel cas, la cause de la mort est associée à l'hypoxie cérébrale (Knieriem et García Hartmann, 2001).

1.5.1.4. Mesures de réduction des captures de mammifères marins

Au plan mondial, les pertes économiques associées aux interactions négatives entre les mammifères marins et les pêcheries (dégâts aux filets, pertes de poissons, ...) sont estimées représenter de 1,6 à 4,5 % de la valeur de poissons déchargés (Northridge et Hofman, 1999).

Ces pertes et les menaces pour certaines espèces ont nécessité la mise au point de solutions en vertu du principe de développement durable. Elles visent à ramener les captures à un niveau peu significatif et compatible avec le développement économique (Northridge et Hofman, 1999). L'utilisation de nouvelles techniques de pêche ont permis de réduire de manière notable le nombre d'animaux pris dans les seines tournantes lors de pêche au thon dans le Pacifique. Ainsi, les captures sont passées de plusieurs centaines de milliers d'individus par an dans les années 60 et 70 (424000 cétacés en 1972) à moins de 5000 actuellement (Berta et Sumich, 1999; Northridge et Hofman, 1999). Une autre technique est la mise en place d'alarmes acoustiques (*pinger*) à l'entrée des filets, sans effet sur la prise de poissons, mais réduisant la capture de mammifères marins (Kraus *et al.*, 1997; Berta et Sumich, 1999; Northridge et Hofman, 1999). Il a été démontré que les marsouins évitaient les filets ainsi équipés tandis que les poissons (harengs, saumon, ...) ne réagissaient pas aux sons émis (Gearin *et al.*, 2000; Culik *et al.*, 2001). Néanmoins, ces dispositifs ne sont pas efficaces pour réduire la capture de phoques (Kraus *et al.*, 1997; Gearin *et al.*, 2000).

1.5.2. Infections virales

Chez les mammifères marins, de nombreuses infections virales sont responsables de maladies, parfois mortelles. Parmi celles-ci, les infections à morbillivirus ont été à l'origine d'épizooties sévères dans différentes populations au travers de tous les océans, justifiant le chapitre particulier qui leur est consacré.

1.5.2.1. Morbillivirus

Les morbillivirus font partie de la famille des *Paramyxoviridae*, virus d'un diamètre de 100 à 300 nm et sont constitués d'une nucléocapside formée de l'ARN monocaténaire de polarité négative encapsidé par la nucléoprotéine N, la phosphoprotéine P et la protéine L, et limités par une enveloppe lipidique d'origine cellulaire contenant deux protéines transmembranaires : l'hémagglutinine (H) et la protéine de fusion (F). La phosphoprotéine P et la protéine L sont les polymérases nécessaires à la transcription et à la réplication virale tandis que l'hémagglutinine H permet la fixation sur le récepteur cellulaire (glycoprotéine). La protéine F (en association avec H) permet la fusion des membranes et la formation des cellules syncytiales (Griffin et Bellini, 1996; Lamb et Kolakofsky, 1996).

Historique

A partir de 1988, les morbillivirus ont été à l'origine de plusieurs épizooties (Tableau 3), dont cinq majeures, qui ont décimé certaines espèces de mammifères marins (Kennedy *et al.*,

1988a; 1988b; 2000; Osterhaus et Vedder, 1988; Grachev *et al.*, 1989; Domingo *et al.*, 1990; Lipscomb *et al.*, 1994b).

Parmi les pinnipèdes, les phoques communs en Mer du Nord furent les plus sévèrement atteints, quelque 18.000 individus étant morts en moins de un an (Dietz *et al.*, 1989b) sur une population de départ estimée à environ 25.000 phoques (Moutou, 1993). Les premiers cas furent rapportés sur les côtes danoises en avril 1988, et l'épizootie s'étendit rapidement, atteignant quasiment toutes les côtes bordant la Mer du Nord jusqu'en 1989 (Dietz *et al.*, 1989b; Schumacher *et al.*, 1990; Heje *et al.*, 1991; Visser *et al.*, 1993a). Au même moment, plusieurs centaines de phoques gris mourraient en présentant une symptomatologie similaire (Harwood *et al.*, 1989; Kennedy *et al.*, 1989; Bergman *et al.*, 1990). Les investigations ont permis d'identifier, d'une part, une infection virale proche de celle causée par un morbillivirus, et d'autre part, d'isoler un virus antigéniquement apparenté au CDV (Kennedy *et al.*, 1988b; 1989; Osterhaus *et al.*, 1988; Osterhaus et Vedder, 1988; Have *et al.*, 1991; Heje *et al.*, 1991) mais distinct, et spécifique du phoque, appelé *phocine distemper virus* ou PDV (Cosby *et al.*, 1988; Mahy *et al.*, 1988; Curran *et al.*, 1990). Depuis 1988, aucune épizootie sévère n'a été rapportée dans cette population bien que des évidences sérologiques suggèrent que le PDV était toujours présent en 1992 au sein des populations de phoques communs et de phoques gris (Visser *et al.*, 1993c).

Fin 1988, un morbillivirus associé à des lésions caractéristiques a été isolé chez des marsouins communs échoués sur les côtes des îles britanniques (Kennedy *et al.*, 1988a; 1991; 1992a) et hollandaises (Visser *et al.*, 1993b). Ce virus, antigéniquement différent de celui des phoques, (McCullough *et al.*, 1991; Trudgett *et al.*, 1991) fut dès lors appelé *porpoise morbillivirus* (PMV). La présence d'anticorps dans des sérums collectés entre 1991 et 1997 chez des marsouins provenant des côtes allemandes (Mers du Nord et Baltique) de tout âge, y compris des individus nés après 1988, confirme que l'infection a persisté dans cette population (Müller *et al.*, 2000) sans que pour autant des lésions spécifiques soient associées (Siebert *et al.*, 2001).

En 1988, le taux de mortalité chez le marsouin n'a pu être déterminé, mais était vraisemblablement peu important. Il n'en est pas de même pour la population de dauphins bleu-blanc de Méditerranée touchée par une épizootie sévère au printemps 1990, le long des côtes espagnoles (Domingo *et al.*, 1990; Osterhaus *et al.*, 1997; van de Bildt *et al.*, 2000) et qui s'est étendue graduellement jusque fin 1992 à tout le bassin méditerranéen (Di Guardo *et al.*, 1992; 1995; Aguilar et Raga, 1993; van Bresseem *et al.*, 1993; Dhermain *et al.*, 1994). Il est vraisemblable que plusieurs milliers d'individus sont morts (Aguilar et Raga, 1993) sur la population estimée à 200.000 dauphins en Méditerranée occidentale (Dhermain *et al.*, 1994). Après l'épizootie, plusieurs cas sporadiques de la maladie ont été rapportés suggérant que le

virus a persisté en Méditerranée (Diguardo *et al.*, 1995; Domingo *et al.*, 1995). Le virus isolé (*dolphin morbillivirus* DMV) était quasiment identique à celui des marsouins (Visser *et al.*, 1993b) et les deux ont été repris sous la même appellation : *cetacean morbillivirus* (CMV).

	Espèces	Origine	Année	Référence
Pinnipède	Phoque commun*	Mer du Nord	1988	Kennedy <i>et al.</i> , 1989
		Mer du Nord	1988	Bergman <i>et al.</i> , 1990
		Mer du Nord	1988	Heje <i>et al.</i> , 1991
		Atlantique O.	1992	Duignan <i>et al.</i> , 1993
	Phoque gris	Mer du Nord	1988	Kennedy <i>et al.</i> , 1989
		Mer du Nord	1988	Bergman <i>et al.</i> , 1990
	Phoque du Baïkal*	Lac Baïkal	1987	Grachev <i>et al.</i> , 1989
		Lac Baïkal	1987	Nunoya <i>et al.</i> , 1990
	Phoque du Groenland	Golfe du St Laurent	1991	Daoust <i>et al.</i> , 1993
		Atlantique N-O.	1988-1993	Duignan <i>et al.</i> , 1997b
Phoque de la Caspienne*	Mer Caspienne	1997	Forsyth <i>et al.</i> , 1998	
	Mer Caspienne	2000	Kennedy <i>et al.</i> , 2000	
Odontocète	Marsouin commun	Mer du Nord	1988	Kennedy <i>et al.</i> , 1991
		Mer du Nord	1990	Kennedy <i>et al.</i> , 1992a
	Dauphin bleu-blanc*	Méditerranée	1990	Domingo <i>et al.</i> , 1992
		Méditerranée	1990-1994	Domingo <i>et al.</i> , 1995
		Méditerranée	1990	Duignan <i>et al.</i> , 1992
		Méditerranée	1991	Di Guardo <i>et al.</i> , 1992
	Grand dauphin*	Côte E. USA	1987-1988	Schulman <i>et al.</i> , 1997
		Golfe du Mexique	1993	Lipscomb <i>et al.</i> , 1994a
		Golfe du Mexique	1993-1994	Lipscomb <i>et al.</i> , 1996
		Méditerranée	1994	Tsur <i>et al.</i> , 1997
	Globicéphale	Côte O. USA	1982-1993	Duignan <i>et al.</i> , 1995b
		Côte E. USA	?	Taubenberger <i>et al.</i> , 2000
Dauphin commun	Mer Noire	1994	Birkun <i>et al.</i> , 1999	
Lagénorhynque obscur	Japon	1998	Uchida <i>et al.</i> , 1999	

Tableau 3 : Populations de mammifères marins ayant présenté des lésions spécifiques d'infection par un morbillivirus. * : épizooties sévères

Plusieurs centaines de phoques de la Caspienne ont été retrouvés morts sur les plages de la Mer Caspienne en 1997 (Forsyth *et al.*, 1998) et plus de 10.000 au printemps 2000 (Kennedy *et al.*, 2000; Stone, 2000). Dans les deux cas, un morbillivirus distinct du CDV et du PDV a pu être détecté (Forsyth *et al.*, 1998; Kennedy *et al.*, 2000). Il semble que la source d'infection soit les carnivores terrestres, probablement des chiens ou des loups (Forsyth *et al.*, 1998; Barrett,

1999). Des études rétrospectives ont permis de mettre en cause des infections par des morbillivirus lors de mortalités importantes de mammifères marins dont initialement, l'étiologie n'avait pas été clairement établie, comme chez phoque crabier en 1953 en Antarctique (Bengston *et al.*, 1991; Barrett, 1999). La première épizootie incontestablement due à une infection par un morbillivirus a eu lieu chez le grand dauphin où la moitié de la population vivant sur la côte est des Etats-Unis a été décimée entre 1987 et 1988 (Lipscomb *et al.*, 1994b; Schulman *et al.*, 1997).

Entre 1993 et 1994, de nouvelles mortalités associées à l'infection par un morbillivirus ont été rapportées chez des grands dauphins dans le Golfe du Mexique (Lipscomb *et al.*, 1994a; Krafft *et al.*, 1995). La caractérisation de ce morbillivirus par RT-PCR a montré que seul le PMV était détecté dans l'épizootie du Golfe du Mexique (Taubenberger *et al.*, 1996). A l'inverse, à la fois le PMV et le DMV étaient impliqués dans l'épizootie de 1988, certains dauphins semblant même être infectés par les deux virus (Taubenberger *et al.*, 1996). Cette absence apparente de spécificité d'espèce a abouti à revoir la nomenclature antérieure, à savoir : *cetacean morbillivirus-1* pour le PMV et *cetacean morbillivirus-2* pour le DMV (Taubenberger *et al.*, 1996). De plus, des évidences suggèrent qu'une infection enzootique ait persisté le long des côtes des Etats-Unis entre ces deux épizooties (Krafft *et al.*, 1995; Taubenberger *et al.*, 1996).

Entre la fin de 1987 et la fin 1988, une épizootie a décimé les phoques du Lac Baïkal (Osterhaus *et al.*, 1989). Les similitudes cliniques et pathologiques avec celles des phoques communs étaient telles qu'une transmission entre les deux espèces de phoques a été suspectée. Le virus isolé, différent du PDV, a initialement été nommé PDV-2 pour le distinguer de l'agent responsable de la maladie du phoque commun. Il est apparu par la suite que le PDV-2 correspondait au CDV (Visser *et al.*, 1990; Mamaev *et al.*, 1995). Il est probable qu'ici aussi, comme pour le phoque de la Caspienne, ce soit les carnivores terrestres infectés par le CDV (Mamaev *et al.*, 1995) qui aient transmis la maladie dans cette population. Des investigations *post mortem* ont permis d'identifier à nouveau le CDV dans l'encéphale de phoques du Baïkal morts en 1992 (Mamaev *et al.*, 1996). De plus, environ 3/4 des phoques sains présentent toujours des anticorps spécifiques (Borisova *et al.*, 1993). Le CDV a également été identifié chez un phoque gris en captivité (Lyons *et al.*, 1993).

En 1994, des mortalités inhabituelles ont affecté la population de dauphins communs de la Mer Noire (Birkun *et al.*, 1999). Des investigations *post mortem* réalisées sur deux individus ont révélé des lésions spécifiques d'infection par un morbillivirus mais, aucun virus n'a pu être isolé des échantillons (Birkun *et al.*, 1999).

	Espèces	Origine	Période	SN	Référence
Pinnipède	Phoque du Groenland	Groenland	1985-1986	CDV	Dietz <i>et al.</i> , 1989a
		Mer de Barents	1987-1989	PDV (>CDV)	Markussen et Have, 1992
		Atlantique N-O	1988-1994	PDV(>CDV)	Duignan <i>et al.</i> , 1997b
	Phoque commun	Canada	1972-1984	PDV	Henderson <i>et al.</i> , 1992
		Atlantique E	1988-1991	CDV	Hughes <i>et al.</i> , 1992
		Norvège	1988-1989	CDV	Krogsrud <i>et al.</i> , 1990
		Atlantique O	1980-1994	PDV (>CDV)	Duignan <i>et al.</i> , 1995d
		Ecosse	1988-1989	CDV	Thompson <i>et al.</i> , 1992
		Atlantique O	1989	CDV	Ross <i>et al.</i> , 1992
		Phoque du Baïkal	Lac Baïkal	1989	CDV
	Phoque gris	Lac Baïkal	1992	?	Borisova <i>et al.</i> , 1993
		Canada	1972-1984	PDV	Henderson <i>et al.</i> , 1992
		Atlantique O	1980-1994	PDV (>CDV)	Duignan <i>et al.</i> , 1995d
		Atlantique E	1988	CDV	Harwood <i>et al.</i> , 1989
		Atlantique E	1988-1991	CDV	Hughes <i>et al.</i> , 1992
		Atlantique O	1989	CDV	Ross <i>et al.</i> , 1992
		Phoque à capuchon	Jan Mayen	1991-1992	PDV (>CDV)
	Atlantique N-O		1988-1994	PDV (>CDV)	Duignan <i>et al.</i> , 1997b
	Phoque marbré	Atlantique N-O	1988-1994	PDV (>CDV)	Duignan <i>et al.</i> , 1997b
		Canada	1972-1984	PDV	Henderson <i>et al.</i> , 1992
	Phoque léopard	Antarctique	1989	CDV	Bengston <i>et al.</i> , 1991
Phoque crabier	Antarctique	1989	CDV	Bengston <i>et al.</i> , 1991	
Phoque moine	Mauritanie	1997	CDV	Osterhaus <i>et al.</i> , 1997	
Morse	Arctique	1990	PDV>CDV	Duignan <i>et al.</i> , 1994	
	Arctique	1984-1993	PDV>CDV	Nielsen <i>et al.</i> , 2000	
Odontocète	Pseudo-orque	Atlantique O	1982-88	DMV, PMV (>CDV, PDV)	Duignan <i>et al.</i> , 1995a
	Globicéphale nain	Atlantique O	1983	PMV	Duignan <i>et al.</i> , 1995a
	Lagénorhynque à bec blanc	Atlantique E	1989-1992	DMV, PMV (>CDV, PDV)	Visser <i>et al.</i> , 1993b
	Marsouin commun	Atlantique E	1989-1992	DMV, PMV (>CDV, PDV)	Visser <i>et al.</i> , 1993b
		Atlantique O	1993-1994	DMV, PMV (>CDV, PDV)	Duignan <i>et al.</i> , 1995a
		Mer du Nord	1991-1997	PMV (>CDV)	Müller <i>et al.</i> , 2000
		Atlantique E	1997	DMV	van Bresseem <i>et al.</i> , 2001
	Dauphin commun	Atlantique E	1989-1992	DMV, PMV (>CDV, PDV)	Visser <i>et al.</i> , 1993b
		Atlantique O	1980-1994	DMV, PMV (>CDV, PDV)	Duignan <i>et al.</i> , 1995a
		Pacifique N-E	1995-1997	DMV	Reidarson <i>et al.</i> , 1998
		Pacifique S-O	1997	DMV	van Bresseem <i>et al.</i> , 2001
	Dauphin bleu et blanc	Atlantique O	1991-1993	PMV (DMV, CDV, PDV : ?)	Duignan <i>et al.</i> , 1995a
		Méditerranée	1991-1993	DMV, PMV (>CDV, PDV)	Visser <i>et al.</i> , 1993b
		Méditerranée	1997-1998	DMV	van Bresseem <i>et al.</i> , 2001
	Dauphin de Risso	Atlantique O	1992-1993	DMV, PMV (>CDV, PDV)	Duignan <i>et al.</i> , 1995a

		Méditerranée	1997	DMV	van Bressems <i>et al.</i> , 2001
	Cachalot pygmée	Atlantique O	1992-1993	PMV	Duignan <i>et al.</i> , 1995a
	Dauphin tacheté de l'Atlantique	Atlantique O	1993	PMV	Duignan <i>et al.</i> , 1995a
	Dauphin de Bornéo	Atlantique O	1994	PMV	Duignan <i>et al.</i> , 1995a
		Atlantique O	1999	DMV	van Bressems <i>et al.</i> , 2001
	Globicéphales	Atlantique O	1986-1994	PMV, DMV (>PPRV, PDV, CDV)	Duignan <i>et al.</i> , 1995b
	Globicéphale noir	Manche	1996	DMV (>PPRV, RPV)	Visser <i>et al.</i> , 1993b
	Lagénorhynque à flanc blanc	Atlantique O		PMV	Duignan <i>et al.</i> , 1995a
	Lagénorhynque obscur	Pacifique S-E	1993-1995	DMV, PMV	van Bressems <i>et al.</i> , 1998
	Dauphin du Cap	Pacifique S-E	1993-1995	DMV, PMV	van Bressems <i>et al.</i> , 1998
	Grand dauphin	Pacifique S-E	1993-1995	DMV, PMV	van Bressems <i>et al.</i> , 1998
		Méditerranée	1997	DMV	van Bressems <i>et al.</i> , 2001
Mysticète	Rorqual commun	Atlantique N	1983	DMV (PDV, CDV-)	Blixenkronne-Møller <i>et al.</i> , 1996
	Petit rorqual	Méditerranée	1993	CDV	Di Guardo <i>et al.</i> , 1995
Sirénien	Lamantin	Floride		DMV, PMV	Duignan <i>et al.</i> , 1995c

Tableau 4 : Populations de mammifères marins séropositifs aux morbillivirus et spécificité des anticorps sériques.; O : ouest ; E : est ; N-O : nord-ouest ; S-O : sud-ouest ; S-E : sud -est.

En 1997, des mortalités sévères ont atteint les phoques moines de Méditerranée, réduisant de 70 % cette population déjà au seuil de l'extinction (Harwood, 1998). Bien qu'un morbillivirus proche du *cetacean morbillivirus* ait été isolé de quelques individus (Osterhaus *et al.*, 1997; van de Bildt *et al.*, 2000), aucune lésion spécifique n'a été observée (Kennedy, 1998), laissant persister un doute sur l'étiologie de la maladie. Récemment, des conclusions similaires ont été obtenues pour un phoque moine et un grand dauphin échoués sur les côtes de Mauritanie (van de Bildt *et al.*, 2001).

En 1995, six dauphins communs échoués sur les côtes californiennes étaient séropositifs pour un morbillivirus et bien qu'aucune lésion spécifique n'ait été identifiée, du RNA viral a été détecté chez trois de ces individus (Reidarson *et al.*, 1998). Il s'agissait des premiers cas rapportés sur les côtes du Pacifique. La première description de lésions spécifiques dans le bassin Pacifique a été réalisée sur un dauphin de Gill échoué au Japon en 1998 (Uchida *et al.*, 1999). Finalement, Van Bressems et collaborateurs (2001) ont démontré la présence d'anticorps contre le DMV chez des mammifères marins provenant de l'Océan Indien, de l'Atlantique sud et du Pacifique ouest.

Dans de nombreuses espèces de mammifères marins, des individus ont présenté une séropositivité (Tableau 4) sans lésion associée. Certaines populations sont par contre apparemment toujours séronégatives dans le Saint-Laurent ou l'Arctique comme le narval, le béluga, l'hyperodon, le rorqual commun, le marsouin commun ou le lagénorhynque à flanc blanc (Nielsen *et al.*, 2000).

Examen nécropsique

Pinnipèdes

A l'examen nécropsique, le diagnostic le plus fréquent chez les phoques était une broncho-pneumonie aiguë purulente (Bergman *et al.*, 1990; Heje *et al.*, 1991) accompagnée d'hypertrophie et d'oedème des ganglions lymphatiques pulmonaires (Kennedy *et al.*, 1989; Krogsrud *et al.*, 1990).

Aucune lésion macroscopique significative n'a été mise en évidence dans la population de phoques moines en 1997 (Kennedy, 1998), ni dans la population de phoques de la Caspienne lors de l'épizootie du printemps 2000 (Forsyth *et al.*, 1998; Kennedy *et al.*, 2000).

Cétacés

Des lésions pulmonaires se caractérisaient par une absence de collapsus et par des foyers de broncho-pneumonie exsudative, parfois accompagnée d'emphysème (Kennedy *et al.*, 1991; 1992a; Di Guardo *et al.*, 1992; Domingo *et al.*, 1992; Kuiken *et al.*, 1994b). Dans certains cas, la seule lésion pulmonaire rapportée était une congestion (Lipscomb *et al.*, 1994a; Tsur *et al.*, 1997; Taubenberger *et al.*, 2000). Ces lésions s'accompagnaient fréquemment de verminose respiratoire (Kennedy *et al.*, 1991; Domingo *et al.*, 1992; Duignan *et al.*, 1992). Des érosions et des ulcérations des lèvres et de la cavité buccale étaient souvent présentes (Domingo *et al.*, 1992; Duignan *et al.*, 1992; Kennedy *et al.*, 1992a; Birkun *et al.*, 1999) ainsi que des ulcères muco-cutanés (Schulman *et al.*, 1997). De plus, des kystes ovariens ont été fréquemment observés chez les dauphins bleu-blanc infectés par le morbillivirus lors de l'épizootie de 1990-1992 (Munson *et al.*, 1998).

Examens histopathologiques

Pinnipèdes

Au niveau pulmonaire, le diagnostic caractéristique était une broncho-pneumonie interstitielle (Kennedy *et al.*, 1989; 2000; Duignan *et al.*, 1993; Belykh *et al.*, 1997). Des membranes hyalines et une prolifération des pneumocytes de type II étaient fréquemment observées dans les alvéoles (Kennedy *et al.*, 1989; Krogsrud *et al.*, 1990; Heje *et al.*, 1991; Baker, 1992a; Daoust *et al.*, 1993). Des cellules syncytiales ont été rapportées dans la lumière

alvéolaire et bronchiolaire (Kennedy *et al.*, 1989; Baker, 1992a; Duignan *et al.*, 1993; Belykh *et al.*, 1997), mais n'étaient pas systématiquement observées (Bergman *et al.*, 1990; Krogsrud *et al.*, 1990; Schumacher *et al.*, 1990; Daoust *et al.*, 1993). Des corps d'inclusion éosinophiles intracytoplasmiques et parfois intranucléaires apparaissaient dans les cellules épithéliales de l'arbre respiratoire ainsi que dans les cellules syncytiales ou les macrophages (Kennedy *et al.*, 1989; Heje *et al.*, 1991). Des infections bactériennes ou parasitaires secondaires compliquaient souvent ces lésions primaires virales (Kennedy *et al.*, 1989; Heje *et al.*, 1991).

Au niveau du système nerveux, de l'encéphalite subaiguë non suppurative était fréquemment diagnostiquée (Kennedy *et al.*, 1989; 2000; Daoust *et al.*, 1993; Duignan *et al.*, 1993; Belykh *et al.*, 1997). Elle se caractérisait par la formation d'agrégats périvasculaires de lymphocytes et de macrophages accompagnés de microgliose, de nécrose neuronale et de démyélinisation (Kennedy *et al.*, 1989; Heje *et al.*, 1991; Daoust *et al.*, 1993; Duignan *et al.*, 1993; Belykh *et al.*, 1997). Des corps d'inclusion intracytoplasmiques et intranucléaires étaient visibles dans les astrocytes, les neurones, les cellules gliales (Kennedy *et al.*, 1989; Heje *et al.*, 1991; Duignan *et al.*, 1993). Des cellules syncytiales pouvaient être observées dans les zones de démyélinisation (Kennedy *et al.*, 1989).

Les ganglions lymphatiques, la rate, le thymus, les amygdales et les plaques de Peyer présentaient une importante déplétion lymphoïde (Krogsrud *et al.*, 1990; Pohlmeier *et al.*, 1990; Schumacher *et al.*, 1990; Belykh *et al.*, 1997; Kennedy *et al.*, 2000). Elle se caractérisait par une hypoplasie des follicules lymphoïdes ainsi que de la pycnose de nombreux lymphocytes, plus particulièrement dans le centre des follicules, laissant parfois apparaître le stroma fibreux (Kennedy *et al.*, 1989; Heje *et al.*, 1991; Pohlmeier *et al.*, 1993). Des corps d'inclusion y étaient rarement observés (Heje *et al.*, 1991) tandis que les cellules syncytiales n'y ont jamais été rapportées.

Des cellules syncytiales ont également été observées dans l'épithélium des muqueuses digestive et vésicale ainsi que dans le foie (Belykh *et al.*, 1997). Par contre, ces syncytia n'ont pas été rapportés lors d'inoculation intrapéritonéale de CDV (Svansson *et al.*, 1993). Des corps d'inclusion éosinophiles intranucléaires et/ou intracytoplasmiques ont été rapportés dans ces cellules syncytiales ainsi que dans les cellules épithéliales de l'estomac, de la cavité pyélique, de la vessie, des conduits biliaires et pancréatiques (Kennedy *et al.*, 1989; 2000) et de la trachée (Bergman *et al.*, 1990).

Par examen immunohistochimique, des antigènes viraux étaient détectés dans divers tissus, plus particulièrement au niveau des cellules épithéliales des voies respiratoires, des alvéoles et des glandes péribronchiques, des voies urinaires (bassin et vessie), des voies digestives (estomac, intestin et conduits pancréatiques), du tissu lymphoïde et du tissu nerveux (neurones, astrocytes, cellules épendymaires). Ils étaient également présents dans les infiltrats

inflammatoires de lymphocytes, de macrophages et dans les cellules syncytiales (Kennedy *et al.*, 1989).

Cétacés

Au niveau pulmonaire, les lésions de broncho-pneumonie interstitielle étaient les plus fréquentes (Kennedy *et al.*, 1991; 1992a; Duignan *et al.*, 1992), parfois accompagnée de fibroplastie interstitielle chez les diverses espèces (Domingo *et al.*, 1992; Lipscomb *et al.*, 1994b; 1996). La réaction était également caractérisée par une prolifération importante de pneumocytes de type II et par la présence de nombreuses cellules syncytiales alvéolaires et bronchioliques (Kennedy *et al.*, 1991; Di Guardo *et al.*, 1992; Domingo *et al.*, 1992; Duignan *et al.*, 1992; 1995b; Lipscomb *et al.*, 1994b; 1996; Schulman *et al.*, 1997; Birkun *et al.*, 1999; Taubenberger *et al.*, 2000). La réaction inflammatoire se compliquait fréquemment d'infestations parasitaires (nématodes) (Kennedy *et al.*, 1991; Duignan *et al.*, 1992) ou fongiques (*Aspergillus fumigatus*). Dans ce dernier cas, la lésion prenait l'aspect d'une pneumonie granulomateuse nécrosante (Domingo *et al.*, 1992; Kennedy *et al.*, 1992a; Lipscomb *et al.*, 1994b; 1994a; 1996).

Au niveau du système nerveux central, de la méningoencéphalite non suppurative était fréquemment observée (Kennedy *et al.*, 1991; Di Guardo *et al.*, 1995; Domingo *et al.*, 1995; Tsur *et al.*, 1997; Taubenberger *et al.*, 2000), plus particulièrement au niveau de la substance blanche (Domingo *et al.*, 1992; Duignan *et al.*, 1992). Des agrégats périvasculaires lymphoplasmocytaires étaient disséminés dans tout le cortex cérébral (Kennedy *et al.*, 1991; Domingo *et al.*, 1992; 1995; Duignan *et al.*, 1992; Tsur *et al.*, 1997). Des cellules syncytiales étaient observées dans des foyers de démyélinisation (Duignan *et al.*, 1992) ou de malacie de la substance blanche chez le dauphin bleu-blanc (Domingo *et al.*, 1992), mais pas chez le marsouin (Kennedy *et al.*, 1991), ni chez le dauphin bleu-blanc après l'épizootie de 1990 (Domingo *et al.*, 1995), ni chez un lagénorhynque de Gill (Uchida *et al.*, 1999). Dans ces deux derniers cas, les seules lésions histologiques étaient situées dans l'encéphale et apparaissaient similaires aux altérations chroniques observées lors de panencéphalite subaiguë sclérosante de l'homme, séquelle rare de la rougeole (Domingo *et al.*, 1995; Uchida *et al.*, 1999). Des hyphes fongiques ont été observés dans le tissu nerveux lors d'encéphalite nécrosante ainsi que des lésions cérébrales de toxoplasmose (Domingo *et al.*, 1992; Schulman *et al.*, 1997).

De la déplétion lymphoïde a été fréquemment rapportée chez les cétacés (Domingo *et al.*, 1992; Duignan *et al.*, 1992; Lipscomb *et al.*, 1994b; Schulman *et al.*, 1997; Birkun *et al.*, 1999), avec parfois chez les marsouins des infiltrats d'éosinophiles dans la rate et le thymus (Kennedy *et al.*, 1991; 1992a). La déplétion se caractérisait par de la lymphocytolyse, une absence de follicules lymphoïdes ou de zones paracorticales visibles avec un infiltrat important de cellules syncytiales (Domingo *et al.*, 1992; Lipscomb *et al.*, 1994a; 1994b). Chez les

marousins, les cellules syncytiales n'ont pas été rapportées dans le tissu lymphoïde (Kennedy *et al.*, 1991; 1992a; Kuiken *et al.*, 1994b), bien qu'elles soient fréquentes chez les autres espèces, principalement au niveau des ganglions (Domingo *et al.*, 1992; Duignan *et al.*, 1992; Lipscomb *et al.*, 1996; Schulman *et al.*, 1997).

Des cellules syncytiales ont également été observées de manière sporadique au niveau de la glande mammaire (Domingo *et al.*, 1992), de l'épithélium pharyngé et œsophagien (Kennedy *et al.*, 1992a), de l'épiderme (Lipscomb *et al.*, 1996) ainsi qu'au niveau des réactions inflammatoires subaiguës à chroniques associées à des infestations parasitaires (Kennedy *et al.*, 1992a).

Des corps d'inclusions intracytoplasmiques et intranucléaires ont été rapportés dans les cellules syncytiales (Domingo *et al.*, 1992; Lipscomb *et al.*, 1994b; Duignan *et al.*, 1995b; Schulman *et al.*, 1997) ainsi que dans des cellules épithéliales pulmonaires, urinaires, ou digestives (Kennedy *et al.*, 1991; 1992a; Duignan *et al.*, 1992; Lipscomb *et al.*, 1994a; Taubenberger *et al.*, 2000). Des inclusions ont également été signalées dans les neurones (Kennedy *et al.*, 1991; Domingo *et al.*, 1995; Tsur *et al.*, 1997) ainsi que dans les astrocytes et les cellules gliales (Duignan *et al.*, 1992), dans les cellules du tissu lymphoïde (Duignan *et al.*, 1992; Lipscomb *et al.*, 1994b; Schulman *et al.*, 1997), dans les macrophages alvéolaires (Kennedy *et al.*, 1992a; Schulman *et al.*, 1997; Birkun *et al.*, 1999) et, dans un cas, dans le noyau de cellules tumorales d'un fibrome testiculaire (Birkun *et al.*, 1999). L'occurrence de ces corps d'inclusion variait d'une espèce à l'autre.

Comme pour les pinnipèdes, des antigènes viraux étaient détectés dans différents tissus par examen immunohistochimique et plus particulièrement au niveau des cellules épithéliales respiratoires, urinaires, digestives, du tissu nerveux et du tissu lymphoïde. Ils étaient également présents dans les infiltrats inflammatoires de lymphocytes, de macrophages et dans les cellules syncytiales (Kennedy *et al.*, 1992a) ainsi que dans les fibroblastes soit lors de réactions inflammatoires chroniques associées à des infestations parasitaires (Kennedy *et al.*, 1992a) soit lors de tumeur (Birkun *et al.*, 1999).

Pathogénie

La pathogénie des infections par le morbillivirus chez les mammifères marins n'a été étudiée expérimentalement que chez les pinnipèdes, par inoculation intranasale d'une suspension de PDV (Harder *et al.*, 1990; 1992). Trois à six jours après l'inoculation, les phoques présentaient de la fièvre parfois suivie de diarrhée aqueuse à hémorragique. Ces premiers symptômes étaient suivis de signes respiratoires et nerveux. La plupart des animaux mouraient 11 à 16 jours après l'inoculation (Harder *et al.*, 1992). Le PDV a pu être isolé des leucocytes circulants six jours après l'inoculation. Cette virémie associée aux cellules mononuclées

sanguines restait détectable jusqu'au 17^e jour (Harder *et al.*, 1990; 1992). Des anticorps neutralisants apparaissaient à partir du 7^e jour chez le phoque commun et après le 16^e jour chez le phoque gris, les taux maxima étant détectés après trois ou quatre semaines chez les animaux survivants (Titenko *et al.*, 1991; Harder *et al.*, 1992). Chez les individus morts, les antigènes du PDV étaient détectables dans différents organes (appareil respiratoire, tractus digestif, tissu lymphoïde et système nerveux central) (Harder *et al.*, 1992), mais n'étaient pas systématiquement présents (Harder *et al.*, 1990). La densité d'antigènes détectés dans le tissu lymphoïde variait en fonction de l'évolution de la maladie selon trois modalités : les animaux mourant précocement avaient de très nombreux antigènes dans tout le tissu lymphoïde ; les animaux morts tardivement présentaient moins d'antigènes dans la rate et les ganglions lymphatiques ; finalement, les antigènes n'étaient plus détectés que dans les amygdales et le colon des animaux morts en dernier lieu (Harder *et al.*, 1992).

Dans la maladie naturelle, l'infection est contractée par les sécrétions corporelles ou par aérosol. Les sites primaires de multiplication virale sont les tissus lymphoïdes du tractus respiratoire antérieur. Trois à quatre jours après l'infection, une virémie associée aux cellules mononucléées sanguines assure la dissémination du virus dans l'organisme. Le virus se localise ensuite au niveau des tissus lymphoïdes (rate, thymus, ganglions, cellules de Küpfer, *Gut Associated Lymphoid Tissue* (GALT)) et au niveau de la moelle osseuse pour une seconde multiplication virale. La réplication a lieu dans les cellules endothéliales, épithéliales, les monocytes et les macrophages. Les signes cliniques apparaissent lors de la virémie et de la multiplication virale dans les différents organes. La réplication au niveau des organes lymphoïdes serait à l'origine de la déplétion lymphoïde responsable d'immunodépression, puis d'infections secondaires, telles que broncho-pneumonies bactériennes (Heje *et al.*, 1991; Baker et Ross, 1992; Munro *et al.*, 1992) ou parasitaires (Kennedy *et al.*, 1989; 1991) ou d'aspergillose (Domingo *et al.*, 1992; Lipscomb *et al.*, 1996). Selon Domingo et collaborateurs (1992), les érosions et les ulcérations présentes dans la cavité buccale chez les dauphins bleu-blanc seraient le résultat d'une infection virale secondaire (Domingo *et al.*, 1992). Pour Schulman et Lipscomb (1999), les lésions ulcératives cutanées observées chez certains dauphins infectés par le morbillivirus sont vraisemblablement des dermatites secondaires dues à l'invasion par des protozoaires ciliés d'ulcères cutanés préexistants (Schulman et Lipscomb, 1999). Initialement, les ulcères seraient provoqués par des septicémies ou des coagulations intravasculaires disséminées associées aux infections concomitantes plus fréquemment observées chez ces dauphins (Schulman et Lipscomb, 1999). De l'exanthème vésiculeux a été rapporté chez des phoques (Visser *et al.*, 1991; Svansson *et al.*, 1993) et serait secondaire à une infection par un calicivirus ou un poxvirus (Svansson *et al.*, 1993).

Deux hypothèses ont été évoquées pour expliquer l'origine des kystes ovariens (kystes folliculaires lutéinisés) observés chez les dauphins durant l'épizootie en Méditerranée. Il pourrait

s'agir soit une altération de l'axe hypothalamo-hypophysaire suite à l'infection virale soit être un effet de type disrupteur endocrinien associé aux taux élevés de PCBs chez ces animaux (Munson *et al.*, 1998).

Pour Duignan et collaborateurs (1992), la présence de cellules syncytiales principalement dans les lésions pulmonaires, est un élément pathognomonique de l'infection par le morbillivirus chez les mammifères marins. Elles sont également souvent observées chez les artiodactyles infectés par le RPV. Mais, comme décrit ci-dessus ainsi que rapporté par Domingo (1992), les cellules syncytiales sont nettement moins fréquentes chez les pinnipèdes que chez les cétacés. Il pourrait s'agir d'un effet plus particulièrement associé au CMV qu'au PDV. En effet, des études génomiques et antigéniques ont démontré que les morbillivirus des cétacés étaient plus proches du RPV et du PPRV que du CDV et du PDV (McCullough *et al.*, 1991; Barrett *et al.*, 1993; Visser *et al.*, 1993b; Blixenkronne-Møller *et al.*, 1996). De même, le PDV était semblable mais distinct du CDV (Cosby *et al.*, 1988; Mahy *et al.*, 1988; Curran *et al.*, 1990) dont il dérive probablement (Barrett, 1999). Il semble ainsi que les morbillivirus des cétacés soient proches de ceux des ruminants et que le morbillivirus du phoque soit très similaire à celui des carnivores.

Epidémiologie

Différents paramètres peuvent être considérés pour expliquer l'apparition de la maladie, caractérisée dans certains cas par des épizooties sévères dans les différentes populations de mammifères marins, parfois tout à fait isolées les unes des autres.

Sensibilité d'espèces

De nombreuses données laissent à penser que les populations de phoques de la Mer du Nord n'avaient jamais été exposées au morbillivirus avant l'épizootie de 1988. En effet, les phoques communs d'Ecosse ne présentaient pas d'anticorps spécifiques avant 1988 mais des titres élevés ont été détectés après le début de l'épizootie (Thompson *et al.*, 1992). La même observation a été faite chez le phoque gris, aucun anticorps n'étant détecté pour la période 1977-1987 (Harwood *et al.*, 1989). Ces observations confirment que le morbillivirus a été introduit dans les populations de phoques de Mer du Nord durant l'année 1988. Par contre, certains phoques communs du Canada, où aucune épidémie sévère n'a été recensée, avaient déjà des titres d'anticorps spécifiques dès 1984 (Duignan *et al.*, 1995d) et en 1989 (Ross *et al.*, 1992). Les mortalités sévères seraient dues à l'introduction du morbillivirus dans des populations indemnes et dès lors, très sensibles (Kennedy, 1999; O'Shea, 2000).

La sensibilité élevée du phoque commun par rapport au phoque gris pourrait s'expliquer par une différence existant au niveau de leurs réponses immunes humorales. En effet, chez le phoque gris, les titres d'anticorps neutralisants sont élevés (Duignan *et al.*, 1995d), persistent

jusqu'à 12 mois (Cornwell *et al.*, 1992) et sont dirigés vers des glycoprotéines d'enveloppe tandis que chez le phoque commun, les titres sont bas, persistent environ six mois et les anticorps sont principalement dirigés, comme chez le chien, vers des antigènes internes (Rima *et al.*, 1990; Cornwell *et al.*, 1992; Duignan *et al.*, 1997a).

Sensibilité d'âge

Lors des épizooties en Mer du Nord et en Méditerranée, des animaux de toutes les tranches d'âge étaient sensibles à l'infection (Kennedy, 1999). Depuis, les quelques cas rapportés aussi bien pour le phoque commun que pour le phoque du Groenland, étaient toujours des individus juvéniles âgés de deux à trois mois (Visser *et al.*, 1993c; Kennedy, 1999). Cette observation confirme l'hypothèse que la chute d'immunité passive d'origine maternelle, aux alentours de trois mois, augmenterait la sensibilité des phoques à la maladie (Harder *et al.*, 1993). De plus, les différences de susceptibilité en fonction de l'âge pourraient refléter le caractère immature du système immunitaire des jeunes individus (Thompson *et al.*, 1992).

Rôle de réservoir

Des phoques de l'Atlantique nord-ouest, au large du Groenland (phoque marbré et phoque du Groenland) présentaient une séropositivité dès 1985 sans épizootie décelable (Dietz *et al.*, 1989a). De même, des phoques du Groenland et des phoques à capuchon séropositifs en 1991 et 1992 en la Mer de Barents, n'ont pas présenté de maladie (Stuen *et al.*, 1994). Il est possible que certains mouvements migratoires aient permis l'infection d'une population indemne comme le phoque commun. En 1987, des irruptions inhabituelles de phoques du Groenland venant de la Mer de Barents ont été observées en Mer du Nord (Goodhart, 1988; McGoutry, 1988; Heide-Jorgensen *et al.*, 1992) qui auraient pu disséminer la maladie (Dietz *et al.*, 1989a). En effet, la prévalence d'anticorps neutralisants le CDV ou le PDV toujours plus élevée dans cette espèce (Dietz *et al.*, 1989a; Stuen *et al.*, 1994; Duignan *et al.*, 1997b), laisse à penser que l'infection soit enzootique chez le phoque du Groenland (Duignan *et al.*, 1997b). Ces phoques sont abondants, forment des colonies denses, migrent sur de longues distances et résistent à la maladie (une seule mortalité rapportée à ce jour associée à l'infection (Daoust *et al.*, 1993)), autant d'éléments qui en font un réservoir et un vecteur pour le virus. Selon Barrett (1999), les carnivores terrestres (loup, chien, renard, ours) auraient pu infecter les phoques du Groenland par le CDV dans les siècles passés, avec la possibilité que celui-ci ait évolué en PDV dans cette population.

De même, il est supposé que les globicéphales puissent intervenir dans la dissémination aux autres espèces. D'une part, l'infection est enzootique dans l'espèce, les individus matures et immatures étant séropositifs sans épidémie (Duignan *et al.*, 1995b). D'autre part ils forment de

grands groupes avec des liens sociaux étroits et se mêlent à d'autres espèces d'odontocètes, favorisant la transmission interspécifique (Duignan *et al.*, 1995a).

Effets anthropiques

L'exposition des mammifères marins aux contaminants a fréquemment été évoquée comme étant un facteur prédisposant aux infections à morbillivirus chez ces espèces. Cette intervention sera exposée dans le chapitre consacré aux effets des toxiques.

Les captures dans les filets de pêche, en réduisant le nombre d'individus dans une population, et par conséquent, le nombre d'individus sensibles, pourraient empêcher l'établissement d'infections enzootiques (van Bresse *et al.*, 1999). En effet, les morbillivirus nécessitent des populations de grande taille pour maintenir une infection enzootique, avec une immunité persistante. Pour cette raison, les mortalités massives de mammifères marins dans les filets de pêche pourraient favoriser la réapparition d'épizooties (van Bresse *et al.*, 1999).

1.5.2.2. Autres virus

Chez les mammifères marins, d'autres virus ont été décrits comme étant responsables de mortalités sporadiques ou épizootiques (Kennedy-Stoskopf, 2001).

Herpèsvirus

Pour les cétacés de la Mer du Nord, un seul cas d'encéphalite à herpèsvirus a été rapporté chez un marsouin (Kennedy *et al.*, 1992b). En dehors de ce cas, des herpèsvirus pourraient être responsable d'oesophagite ulcérate chez le béluga (De Guise *et al.*, 1995a) et le marsouin (Kennedy *et al.*, 1992b). Néanmoins, les virus n'ont jamais été isolés de ces lésions et de plus, des ulcères similaires sont présents chez des animaux séronégatifs (Mikaelian *et al.*, 1999). Récemment, deux nouveaux alpha-herpèsvirus ont été rapportés chez deux grands dauphins échoués sur la côte atlantique des Etats-Unis (Blanchard *et al.*, 2001). Dans les deux cas, les lésions se caractérisaient par des foyers de nécrose dans divers organes, accompagnées de corps d'inclusion intranucléaires.

Chez les pinnipèdes, deux herpès ont été caractérisés (PhHV-1 et PhHV-2) (Kennedy-Stoskopf, 2001). Le PhHV-1, fort proche de l'herpès canin, a été isolé la première fois lors d'une épizootie responsable de la mort de la moitié des phoques présents dans un centre de réhabilitation (Osterhaus *et al.*, 1985). La maladie se caractérise par de la stomatite, des vomissements, de la diarrhée et de la fièvre et de la broncho-pneumonie et de la stomatite érosive étaient visibles à l'autopsie (Kennedy-Stoskopf, 2001).

Lors l'épizootie de PDV en 1988, un herpès a été initialement isolé des phoques communs, suggérant qu'il soit responsable de la maladie (Osterhaus, 1988). Ultérieurement, il est apparu qu'il s'agissait d'une infection virale secondaire (Osterhaus et Vedder, 1988).

Virus influenza

Chez les cétacés, deux virus influenza A ont été isolés d'un même globicéphale échoué sur les côtes des Etats-Unis. L'animal présentait essentiellement de l'hémorragie pulmonaire (Hinshaw *et al.*, 1986). Il n'y a pas d'autres cas rapporté chez les cétacés.

Chez les pinnipèdes, plusieurs sous-types de virus influenza A ont été isolés lors de mortalités massives parmi des phoques communs sur les côtes des Etats-Unis (Geraci *et al.*, 1982). La lésion la plus significative était de la pneumonie accompagnée de bronchite et de bronchiolite nécrosante ainsi que d'alvéolite nécrosante. Il semble que la mortalité ait été exacerbée soit par une infection concomitante par un mycoplasme, soit par de mauvaises conditions climatiques (Geraci *et al.*, 1982).

Un virus influenza B a été isolé chez un phoque commun présentant des troubles respiratoires, échoué en 1999 aux Pays-Bas. Il s'agissait d'un virus très proche de ceux qui sont décrits chez l'homme et le phoque pourrait en être le réservoir (Osterhaus *et al.*, 2000).

1.5.3. Infestations parasitaires

1.5.3.1. Petits cétacés

Les infestations par les nématodes de la famille des Pseudalidae (*Pseudalius inflexus*, *Torynurus convolutus* et *Halocercus invaginata*) prédisposent aux infections bactériennes secondaires responsables de broncho-pneumonies. Cette combinaison représente une des premières causes de mortalité des petits cétacés, principalement le marsouin, que ce soit sur les côtes britanniques (Baker, 1992b; Baker et Martin, 1992; Jepson *et al.*, 2000), hollandaises (García Hartmann, 1997) ou allemandes (Benke *et al.*, 1998; Siebert *et al.*, 2001). Il est fréquent que ces trois espèces de parasites soient présentes simultanément et il n'est pas possible de définir laquelle est la plus pathogène. On constate seulement que les réactions inflammatoires sont plus sévères autour des larves (Howard *et al.*, 1983). La prévalence d'infestation parasitaire pulmonaire est souvent élevée, atteignant 60 % pour les marsouins échoués sur les côtes hollandaises (van Nie, 1989) et allemandes (Siebert *et al.*, 2001) et jusqu'à 69 % pour les animaux échoués sur les côtes britanniques (Jepson *et al.*, 2000). Il en est de même pour les animaux pris dans des filets (Balbuena *et al.*, 1994). Les infections bactériennes secondaires à cette infestation, prédisposent également à des processus de septicémie et d'abcédation. Dans certains cas, les infestations sont tellement sévères qu'elles provoquent des obstructions des

voies respiratoires (Brosens *et al.*, 1996; Measures, 2001), pouvant réduire les capacités de chasse et de plongée des individus (Siebert *et al.*, 2001). De plus, *P. inflexus* infeste le ventricule droit et les vaisseaux sanguins pulmonaires, induisant des endocardites, des vasculites et des thromboses qui peuvent s'avérer fatales (Baker et Martin, 1992; Siebert *et al.*, 2001).

Les infestations de l'estomac par *Anisakis simplex* ont souvent été associées aux ulcères du premier compartiment gastrique des petits cétacés (Baker, 1992b; Baker et Martin, 1992; Kirkwood *et al.*, 1997; Siebert *et al.*, 2001). Les ulcères résultent de la fixation des larves à la muqueuse gastrique (Howard *et al.*, 1983). Ces lésions peuvent favoriser des hémorragies fatales (Kirkwood *et al.*, 1997) ou servir de voie de pénétration pour des agents infectieux (Wünschmann *et al.*, 1999b).

Stenurus minor est un nématode qui infeste souvent massivement les sinus périmyotympaniques sans lésion associée, même dans les cas les plus sévères (Stroud et Roffe, 1979; Brosens *et al.*, 1996; Faulkner *et al.*, 1998). Néanmoins, l'infestation pourrait favoriser la pénétration de germes (García Hartmann, 1997) ou altérer les capacités de navigation (Howard *et al.*, 1983). Ainsi, son intervention a été évoquée lors d'échouages massifs de cétacés, mais son rôle définitif n'a pas pu être démontré avec certitude (Measures, 2001), à l'inverse de l'infestation cochléaire par *Nasitrema* sp., un trématode qui n'est pas décrit en Mer du Nord mais qui serait responsable d'échouages massifs (Morimitsu *et al.*, 1986; 1987). D'autres parasites sont fréquemment observés chez les petits cétacés, mais sont peu pathogènes.

1.5.3.2. Pinnipèdes

Parmi les pinnipèdes, deux types d'infestation parasitaire peuvent être distingués (García Hartmann, 1997). D'une part, des infestations progressives par des parasites peu pathogènes qui induisent peu de réaction du système immunitaire, comme pour les parasites gastro-intestinaux. D'autre part, des infestations parasitaires présentant un maximum de gravité au moment où le phoque est subadulte. Il s'agit principalement de parasites très pathogènes infestant les voies respiratoires et sanguines (García Hartmann, 1997). Parmi ceux-ci, *Otostrongylus circumlitus* est un nématode présent dans les voies respiratoires, l'artère pulmonaire et le ventricule droit de différentes espèces de pinnipèdes (Measures, 2001), pouvant atteindre une prévalence de 60 % chez les phoques communs de plus de trois mois (Van der Kamp, 1987). Les lésions associées sont de la bronchite avec (sub-)obstruction des voies respiratoires et de l'artérite chronique qui favorisent, comme chez le marsouin, des infections secondaires responsables de septicémie et de broncho-pneumonie fatales (Measures, 2001). Un autre nématode des voies respiratoires est *Parafilaroides gymnurus* dont les adultes, localisés dans le parenchyme pulmonaire ne provoquent que peu de réaction inflammatoire, tandis que les larves L1 sont responsables de bronchiolite et de broncho-pneumonie aiguë

accompagnées de formation d'abcès (Measures, 2001). Comme pour *O. circumlitus*, la sensibilité est plus élevée chez les jeunes, vraisemblablement par un manque de maturité du système immunitaire ou par l'ingestion préférentielle de proies servant d'hôte intermédiaire dans le cycle vital du parasite (García Hartmann, 1997; Measures, 2001). Il a été suggéré que ces deux espèces de parasites puissent jouer le rôle de vecteur pour des agents infectieux tels que *Brucella* sp. et Morbillivirus. (Heide-Jorgensen *et al.*, 1992; Garner *et al.*, 1997).

1.5.3.3. Grands cétacés

Chez les grands cétacés, les infestations vasculaires par *Crassicauda* sp., principalement au niveau des veines rénales, de la veine cave ou dans les artères mésentériques, pourraient jouer un rôle régulateur des populations de rorqual commun (Lambertsen, 1986; Raga, 1997). En effet, 94,3 % des rorquals étudiés lors d'opérations baleinières présentaient des infestations sévères accompagnées de thrombi veineux. Ces lésions pourraient être fatales par insuffisance rénale (Lambertsen, 1986). Les infestations massives du second estomac par *Anisakis* sp. pourraient prédisposer, comme chez les petits cétacés, à des ulcères perforants responsables de péritonites (Lambertsen, 1997).

1.5.4. Infections bactériennes

Les maladies bactériennes, secondaires à des infections virales ou des infestations parasitaires, apparaissent de plus en plus comme les premières causes de mortalité infectieuses des mammifères marins en milieu sauvage (Dunn *et al.*, 2001). Il s'agit de septicémie et de broncho-pneumonie qui atteignent les cétacés (Baker et Martin, 1992; García Hartmann, 1997; Kirkwood *et al.*, 1997; Jepson *et al.*, 2000; Siebert *et al.*, 2001) et les pinnipèdes (Baker, 1989; Krogsrud *et al.*, 1990; Heje *et al.*, 1991; Baker *et al.*, 1998). Ce sont souvent de germes opportunistes, appartenant à la flore normale et qui provoquent la maladie lorsque la santé de l'animal est déjà compromise (García Hartmann, 1997; Higgins, 2000). De plus, l'absence de données relatives à l'évolution clinique de la maladie sur les animaux échoués et les dérives bactériennes *post mortem* compliquent l'interprétation de leur rôle pathogène.

1.5.4.1. Septicémie

La septicémie est très fréquente chez les mammifères marins échoués et peut être la conséquence d'une infection immunodépressive ou d'un processus de débilitation chronique (García Hartmann, 1997). En général, le processus léthal est très rapide et peu de lésions sont présentes (García Hartmann, 1997). Siebert et collaborateurs (2001) rapportent 14 cas de septicémie sur 133 marsouins examinés. Dans 11 cas, des streptocoques α - et β -hémolytiques étaient isolés. *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Escherichia coli* hémolytique et *Staphylococcus*

aureus étaient également identifiés. La plupart de ces septicémies étaient secondaires à des lésions de broncho-pneumonie aiguë (Siebert *et al.*, 2001).

1.5.4.2. Broncho-pneumonie

Comme signalé dans le chapitre consacré à la morbillivirose, les broncho-pneumonies aiguës figurent parmi les lésions les plus fréquemment associées à l'infection par le PDV chez les pinnipèdes ou par le CMV chez les cétacés. Parmi les marsouins échoués sur les côtes allemandes, Siebert et collaborateurs (2001) rapportent 56 % de cas de broncho-pneumonie suppurative dont plus de la moitié était attribuée à la présence de streptocoques α - et β -hémolytiques. Néanmoins, ces germes ont également été isolés de poumons sans lésions ou d'animaux capturés dans des filets, compliquant l'interprétation de leur pathogénie (Siebert *et al.*, 2001). Par contre, *Pasteurella haemolytica* et *Vibrio alginolyticus* sont les germes les plus fréquemment isolés des broncho-pneumonies des marsouins et des autres cétacés échoués sur les îles britanniques (Baker, 1992b; Baker et Martin, 1992).

1.5.4.3. Brucellose

Brucella sp. a initialement été isolé sur des mammifères marins échoués sur les côtes écossaises et était différent de celui des autres mammifères (Foster *et al.*, 1996; Dunn *et al.*, 2001). Il a été proposé que le germe isolé des mammifères marins soit appelé *B. maris* (Jahans *et al.*, 1997). Néanmoins, il semble que la bactérie des cétacés ne soit pas identique à celle des pinnipèdes (Foster *et al.*, 1996; Nielsen *et al.*, 2001) et que l'on puisse les considérer comme deux espèces différentes : *B. cetacea* et *B. pinnipediae* infectant respectivement les cétacés et les phoques (Cloeckaert *et al.*, 2001).

Des évidences sérologiques d'infection par *Brucella* sp. ont été obtenues de cétacés (petits et grands) et de pinnipèdes provenant de l'Atlantique nord (Foster *et al.*, 1996; Jepson *et al.*, 1997; Tryland *et al.*, 1999; Nielsen *et al.*, 2001). Sur les côtes britanniques, la séropositivité est plus élevée chez les cétacés (31 % pour les marsouins et les dauphins communs) que pour les pinnipèdes (8 % pour les phoques communs et 10 % pour les phoques gris) (Jepson *et al.*, 1997). De plus, selon Jepson et collaborateurs (1997), la présence d'anticorps chez de très jeunes individus est vraisemblablement l'évidence d'une immunité passive maternelle plutôt que le résultat d'une infection par *Brucella* sp..

Des études rétrospectives ont permis de mettre en évidence la séropositivité d'un rorqual boréal dès 1983 (Tryland *et al.*, 1999) et de bélugas dès 1984 (Nielsen *et al.*, 2001).

Jepson et collaborateurs (1997) suggèrent que l'infection puisse être à l'origine d'altérations de la reproduction. Selon Dunn et collaborateurs (2001), un tel effet pourrait avoir

un impact particulièrement négatif sur certaines espèces sévèrement menacées. Jusqu'à ce jour, chez les mammifères marins sauvages, aucune lésion n'a été rapportée associée à l'infection (Nielsen *et al.*, 2001). Néanmoins, parmi des dauphins captifs, il semble que la brucellose soit à l'origine de deux cas d'avortement (Nielsen *et al.*, 2001). Dans les deux cas, de la placentite aiguë suppurative avec vasculite nécrosante était associée à la présence d'aggrégats intracytoplasmiques de petites bactéries gram négatives (Miller *et al.*, 1999). L'examen par immunohistochimie a permis de mettre en évidence des antigènes de *B. abortus* principalement en surface de l'épithélium placentaire mais également dans l'épithélium du placenta et dans l'endothélium vasculaire. Un troisième dauphin du même delphinarium est mort soudainement et *Brucella* sp. fut isolé d'un nodule pulmonaire. Néanmoins, l'intervention du germe dans la lésion et dans la mort de l'animal n'a pas été démontrée (Miller *et al.*, 1999).

Le mode de transmission de la maladie n'est pas connu. Néanmoins, des examens par immunohistochimie et par microscopie électronique ont permis d'identifier le germe dans des nématodes respiratoires (*Parafilaroides* sp.) d'un phoque infecté, suggérant que ces parasites puissent intervenir dans la transmission (Garner *et al.*, 1997).

Brucella sp. des mammifères marins est capable d'infecter d'autres espèces. Ainsi, suite à l'inoculation expérimentale d'un groupe de six vaches gestantes avec le germe isolé d'un phoque commun, deux femelles ont présenté une séroconversion et ont avorté, les autres restant indemnes d'évidence d'infection (Rhyan *et al.*, 2001). De même, un chercheur travaillant sur une souche isolée d'un mammifère marin a présenté des signes cliniques d'infection confirmés par une séroconversion (Brew *et al.*, 1999).

1.5.5. Toxiques

Les mammifères marins en Mer du Nord vivent dans un milieu pollué et accumulent des contaminants stables via un processus de bioamplification, ce qui permet d'attendre chez ces espèces des lésions et altérations comparables à celles connues chez les autres espèces animales exposés aux mêmes substances.

Deux catégories d'effets toxiques peuvent être considérées chez les mammifères marins : soit un effet direct (léthal ou sublétal), soit un effet indirect. Il n'y a d'effet direct léthal chez les cétacés mais des cas d'intoxications aiguës ont été rapportés chez les phoques (Hyvärinen et Sipilä, 1984; Reijnders *et al.*, 1999). De nombreux effets directs sublétaux sont supposés : augmentation de la sensibilité vis-à-vis des maladies, altération de la reproduction, immunosuppression, sensibilité aux tumeurs, ... Finalement, les effets indirects sont, entre autre, liés aux conséquences des toxiques sur les proies des mammifères marins.

Ainsi, s'il n'y a pas de cause de mortalité directe associée à l'exposition aux toxiques, il est vraisemblable que ces derniers favorisent certains processus morbides. Ce caractère prédisposant justifie la présentation des principales évidences dans cette revue consacrée aux causes de mortalité.

1.5.5.1. Immunodépression et sensibilité aux maladies infectieuses

L'intervention des contaminants marins et plus particulièrement des PCBs a été souvent évoquée à la fin des années 80 pour tenter d'expliquer la sensibilité des mammifères marins aux épizooties à morbillivirus (Hall *et al.*, 1992; Mitchell et Kennedy, 1992; Simmonds, 1992). Cette prédisposition éventuelle a été et est toujours sujette à de nombreuses controverses, certains considérant que les PCBs ne favorisent pas les épizooties à morbillivirus, d'autres suggérant que ces substances contribuent à la sévérité de l'épidémie (Busbee *et al.*, 1999; O'Shea, 2000; Ross *et al.*, 2000). Néanmoins, des épidémies sévères provoquées par d'autres morbillivirus, comme celles de rougeole ou de peste bovine, sont décrites depuis des siècles chez les mammifères terrestres, bien avant l'apparition des contaminants (Kennedy, 1999).

Lors des différentes épizooties récentes, de nombreux individus infectés avaient des taux élevés de PCBs dans leurs tissus (Aguilar et Borrell, 1994; Kuehl et Haebler, 1995; Guitart *et al.*, 1996) et présentaient des évidences de déplétion immunitaire. Les PCBs provoquant des altérations immunitaires en situation expérimentale chez les mammifères marins (de Swart *et al.*, 1994; 1995b; Ross *et al.*, 1995; 1996), il a été suggéré que ces substances puissent être en cause pour les populations vivant dans un écosystème marin très pollué. Néanmoins, aucune différence de sensibilité à l'infection n'a été observée suite à l'inoculation expérimentale de PDV à deux groupes de phoques communs, l'un étant exposé à des PCBs, l'autre pas (Harder *et al.*, 1992). En outre, il est très difficile de distinguer l'effet immunosuppresseur propre à l'infection de celui induit par les contaminants (Kennedy, 1999). En définitive, les mortalités élevées observées parmi les mammifères marins suite à l'infection par le morbillivirus résultent exclusivement de l'introduction du virus dans des populations sensibles (Kennedy, 1999), les contaminants pouvant avoir un rôle de contribution (Ross *et al.*, 2000).

Plusieurs études expérimentales ont été réalisées sur des phoques captifs afin de corréler l'exposition aux organochlorés avec la fonction immune. Ainsi, deux groupes de phoques ont été nourris durant deux ans et demi avec pour l'un, des poissons capturés dans l'Atlantique, ayant des concentrations tissulaires faibles en organochlorés (groupe témoin) et pour l'autre, des poissons de la Mer Baltique ayant des concentrations tissulaires 4 à 10 fois plus élevées en organochlorés (de Swart *et al.*, 1994; 1995a; 1996). Dans le groupe contaminé, l'activité des cellules NK était diminuée ainsi que la réponse proliférative des lymphocytes T stimulés par des substances mitogènes, ces altérations laissant présager une plus grande sensibilité aux infections virales (de Swart *et al.*, 1994; 1996; Ross *et al.*, 1996). Seule l'immunité cellulaire était

affectée, aucun effet n'ayant été observé sur l'immunité humorale (de Swart *et al.*, 1995b). Les phoques ont été soumis également à un test cutané d'hypersensibilité et la réponse a été différée chez les phoques contaminés, confirmant ainsi une altération immune (Ross *et al.*, 1995). Afin de tester l'effet d'une libération d'organochlorés stockés dans les graisses, les animaux ont été soumis à un jeûne de deux semaines. Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes et ce malgré une mobilisation des organochlorés corrélée à une concentration sanguine doublée (de Swart *et al.*, 1995a; 1996). Dans les deux cas, le taux de lymphocytes circulant a chuté tandis que l'activité des cellules NK augmentait légèrement.

A côté de ces études expérimentales, les analyses réalisées au départ des animaux échoués ne permettent pas encore de démontrer la participation éventuelle des contaminants aux maladies infectieuses (Kuiken *et al.*, 1994a; Jepson *et al.*, 1999; Siebert *et al.*, 1999). Ainsi, Kuiken et collaborateurs (1994) ont comparé les concentrations en PCBs dans la graisse sous-cutanée de marsouins échoués entre 1989 et 1992 le long des côtes de Grande-Bretagne, en distinguant les animaux morts d'un processus infectieux, de ceux morts d'une cause traumatique. Aucune différence significative n'a permis d'étayer l'hypothèse d'un effet immunotoxique des PCBs (Kuiken *et al.*, 1994a). Par contre, une étude similaire réalisée sur des marsouins échoués sur les mêmes côtes entre 1990 et 1996 (Jepson *et al.*, 1999) débouchait sur une conclusion inverse. En effet, la concentration en PCBs dans la graisse sous-cutanée était respectivement de 13,6 mg/kg et de 31,1 mg/kg de lipide extractible selon que les marsouins étaient morts d'un processus traumatique ou infectieux, quelque soit l'état nutritionnel des individus (Jepson *et al.*, 1999). La différence entre les deux études serait à mettre en rapport avec le plus grand nombre d'individus et le meilleur état de fraîcheur des carcasses dans l'étude de Jepson et collaborateurs (1999). De plus, une différence significative de concentrations est rapportée entre mâles et femelles adultes, respectivement 43 et 14 mg/kg (Jepson *et al.*, 1999). Bien que ces concentrations soient similaires à celles qui ont été obtenues en fonction de la cause de mortalité, il n'y avait pas de prédisposition sexuelle aux maladies infectieuses. En effet, on pourrait s'attendre à ce que les mâles adultes meurent plus fréquemment d'un processus infectieux. Récemment, une étude similaire a comparé les teneurs en métaux lourds sur 86 marsouins échoués sur les mêmes côtes (Bennett *et al.*, 2001). Bennett et collaborateurs (2001) démontrent une concentration hépatique en certains métaux lourds, y compris le mercure, plus élevée chez les animaux mourant de processus infectieux par rapport aux marsouins morts de cause traumatique. Siebert et collaborateurs (1999) ont, pour leur part, analysé les concentrations tissulaires (muscle, rein et foie) en mercure et méthylmercure de marsouins échoués ou capturés sur les côtes allemandes. Aucune différence de concentration de ces deux substances n'a été observée selon la cause de mortalité ou le sexe. De plus, aucune lésion caractéristique d'intoxication aiguë ou chronique au mercure n'a pu être démontrée (Siebert *et al.*, 1999). Néanmoins, il semble que la sévérité des lésions pulmonaires puisse être corrélée avec les

concentrations en mercure, celui-ci représentant, selon Siebert et collaborateurs, un facteur non-spécifique de morbidité pour les marsouins.

1.5.5.2. Altérations de la reproduction et disrupteurs endocriniens

Il a été souvent suggéré que les diminutions de certaines populations de mammifères marins soient à mettre en relation avec des altérations de la reproduction consécutives à l'exposition aux contaminants (Helle, 1976; Reijnders, 1986; Baker, 1988; García Hartmann, 1997). Ainsi, la contamination par le DDT et les PCBs aurait été à l'origine de sténose utérine, responsable d'une diminution de la fertilité chez le phoque marbré et le phoque gris (Helle, 1976; Baker, 1988). Néanmoins, aucune corrélation ne prouve formellement l'existence d'une relation entre la concentration en contaminants dans les tissus de mammifères marins et des effets sur la reproduction (Addison, 1989). Cependant, une étude réalisée sur des phoques nourris avec des poissons fortement contaminés par des organochlorés (PCBs et DDE), a montré une diminution du taux de reproduction chez ces derniers, vraisemblablement par un retard d'implantation de l'embryon (Reijnders, 1986). Mais, d'autres composants alimentaires variaient également et il est possible que plusieurs substances interviennent de manière simultanée (Addison, 1989; García Hartmann, 1997). Des résultats préliminaires sur des grands dauphins en semi-liberté ont démontré un plus faible taux de survie du premier jeune dont les mères étaient les plus contaminées par les organochlorés (Reddy *et al.*, 2001). La mortalité de ces jeunes pourrait être mis en rapport avec d'une part, le caractère primipare des femelles, responsable d'une exportation massive d'organochlorés via le lait et d'autre part, un manque d'expérience maternelle (Reddy *et al.*, 2001).

Une variété de contaminants (artificiels et naturels) peut provoquer des altérations de la fonction endocrinienne (Yamato *et al.*, 1996; Reijnders *et al.*, 1999; O'Hara et O'Shea, 2001). Parmi ceux-ci, un intérêt tout particulier est posé sur les xéno-oestrogènes, substances qui peuvent agir comme agonistes ou antagonistes de l'action des oestrogènes (Meurens *et al.*, 2000). Les principaux sont les PCBs, les organochlorés (DDT, lindane, ...), les dioxines et furannes, et les alkylphénols polyéthoxylates. Leur action potentielle est multiple, comme par exemple une action sur le récepteur à oestrogènes ou sur le récepteur Ah (aryl hydrocarbène) ou en agissant sur le métabolisme des oestrogènes (Yamato *et al.*, 1996; Meurens *et al.*, 2000). Néanmoins, il semble qu'aux doses environnementales, ces substances n'ont pas d'effet disrupteur endocrinien chez les mammifères marins (O'Hara et O'Shea, 2001).

1.5.5.3. Induction de tumeurs

Peu de cas de tumeurs sont rapportés parmi les mammifères marins, et leur mise en évidence nécessite l'examen d'une large population sur une longue période de temps (Reijnders *et al.*, 1999). Néanmoins, la fréquence des tumeurs, bénignes et malignes, est très élevée dans

les quelques 500 bélugas qui vivent dans l'estuaire du Saint-Laurent (Canada) (Martineau *et al.*, 1988; 1994; De Guise *et al.*, 1994b; 1995b). De par le monde, 75 cas de tumeurs ont été rapportés chez les cétacés, dont 28 rien que pour ces bélugas (De Guise *et al.*, 1994b), tandis que les bélugas d'autres régions n'en sont pas affectés. Environ un quart des individus adultes autopsiés présentaient des néoplasmes malins et l'incidence annuelle de tumeurs, rapportée à l'échelle de la population est de 233 pour 100.000 (Martineau *et al.*, 1994; 1999). Cette incidence est parmi les plus élevées du règne animal, similaire à celle rapportée chez l'homme ou chez les animaux domestiques. A l'exception du papillome gastrique d'origine virale (De Guise *et al.*, 1994a), aucune étiologie précise n'est connue (De Guise *et al.*, 1994b; De Guise *et al.*, 1995b). Néanmoins, l'exposition chronique à certains contaminants pourrait être responsable de l'incidence élevée de tumeurs (Martineau *et al.*, 1994), soit par un processus d'initiation et de promotion, soit par une altération de l'immunité anti-cancéreuse (De Guise *et al.*, 1994b; 1995b). Parmi les substances suspectées, présentes aussi bien dans l'eau du Saint-Laurent que dans les tissus des bélugas, figure en première place le benzo[a]pyrène (BaP) (Martineau *et al.*, 1988; 1994; De Guise *et al.*, 1994b; 1995b). Le BaP est un initiateur de tumeurs (Cotran *et al.*, 1994a) et des altérations génomiques spécifiques (adduits de l'ADN) ont été mises en évidence chez les bélugas du Saint-Laurent tandis que la population de l'Arctique en était indemne (Martineau *et al.*, 1988; 1994). Les adduits de l'ADN évaluent de manière spécifique l'interaction entre une substance carcinogène et l'acide nucléique, ces altérations prédisposant aux tumeurs (Martineau *et al.*, 1988; Cotran *et al.*, 1994a). Les PCBs, également présents dans l'environnement et dans les tissus des bélugas, pourraient favoriser le développement de tumeurs comme promoteurs de cellules initiées (Martineau *et al.*, 1994; De Guise *et al.*, 1994b; 1995b). La diminution de l'immunité est un autre mécanisme évoqué pour expliquer l'incidence élevée de tumeurs dans la population de bélugas du Saint-Laurent. L'immunité anti-tumorale résulte essentiellement de l'action des lymphocytes T cytotoxiques et des cellules NK (Cotran *et al.*, 1994a). Finalement, les PCBs présents dans les tissus des béluga pourrait agir comme immunosuppresseur direct, modifiant également l'immunité anti-tumorale (De Guise *et al.*, 1994b; 1995b).

En dehors de la population de bélugas du Saint-Laurent, les tumeurs ne sont observées qu'exceptionnellement parmi les mammifères marins de la Mer du Nord (van Nie, 1989; Baker, 1992b; Baker et Martin, 1992; Jepson *et al.*, 2000). Parmi les rares cas rapportés, un adénocarcinome gastrique a été diagnostiqué chez un marsouin échoué sur les côtes allemandes. Cependant, les évidences étaient incomplètes pour incriminer un effet carcinogène des contaminants présents dans l'environnement (Breuer *et al.*, 1989).

Parmi les pinnipèdes, l'incidence la plus élevée de tumeur a été observée dans la population de lions de mer de Californie (Gulland *et al.*, 1996). Entre 1979 et 1994, 18 % des animaux échoués sur les côtes de Californie (USA) présentaient des carcinomes à cellules

transitionnelles et selon Gulland et collaborateurs (1996), les contaminants environnementaux pourraient jouer un rôle dans l'étiologie de cette tumeur.

2. OBJECTIF ET PLAN DU TRAVAIL

L'objectif de notre étude était d'identifier les lésions et causes de mortalités observées chez les petits et les grands cétacés ainsi que chez les pinnipèdes échoués sur les côtes continentales de la baie sud de la Mer du Nord. A partir des observations nécropsiques et des examens *post mortem*, effectués entre 1990 et 2000, il a été tenté de déterminer l'origine des lésions ainsi que les conséquences des activités humaines sur ces espèces vivant dans un milieu soumis à de fortes pressions anthropiques.

La réalisation de cet objectif a pu être atteint pour les espèces considérées par l'intermédiaire de plusieurs jalons :

- Autopsie systématique des animaux échoués, nécessitant l'adaptation ou la création de protocoles spécifiques d'examen nécropsique ;
- Inventaire détaillé des lésions et de leurs origines, avec un intérêt tout particulier pour les infections à morbillivirus ;
- Identification de l'impact des activités humaines (pêche, loisir, pollution) ;
- Corrélation entre les principales lésions et les causes de mortalité afin de définir les principaux processus morbides et de générer des hypothèses spécifiques d'échouage à la situation dans la baie sud de la Mer du Nord ;
- Evaluation des principales menaces au niveau des populations.

L'étude 1 analyse la situation des petits cétacés échoués entre 1990 et 2000 en utilisant le marsouin comme modèle. L'étude 2 décrit les lésions associées à un épisode de morbillivirose chez les phoques durant l'été 1998 tandis que l'étude 3 s'attarde à la situation des petits pinnipèdes échoués entre 1990 et 2000. L'étude 4 décrit les lésions et les causes de mortalité des cachalots lors de deux échouages massifs en développant une hypothèse expliquant de tels accidents. Finalement, l'étude 5 expose les lésions associées à une infection par un morbillivirus chez deux rorquals communs, cette description étant originale.

En définitive, cette enquête, réalisée sur 10 ans, permet d'appréhender les principales menaces qui pèsent sur ces animaux et d'en clarifier les origines, plus spécifiquement le rôle des infections par les morbillivirus ainsi que celles qui sont générées par les différentes activités humaines ayant des répercussions sur le milieu marin.

3. PRESENTATION SYNOPTIQUE DES ETUDES

3.1. Lésions et causes de mortalité des marsouins échoués sur les côtes belge et du nord de la France entre 1990 et 2000

Post-mortem findings and causes of death of harbour porpoises (Phocoena phocoena) stranded from 1990 to 2000 along the coastlines of Belgium and Northern France

Journal of Comparative Pathology, accepté pour publication

Entre 1990 et 2000, 55 marsouins échoués sur le littoral belge et du nord de la France ont été examinés dans le cadre du travail du groupe MARIN. Les buts de cette étude étaient d'identifier sur chaque individu les lésions, leurs origines et les causes de mortalité, afin de mieux connaître l'état de santé de la population de cette espèce de cétacé la plus représentée en Mer du Nord. Au départ des principales observations *post mortem*, un modèle pathogénique devait être établi permettant d'expliquer les principales causes de mortalité. En effet, durant la seconde moitié du XXe siècle, le déclin de cette population en Mer du Nord a souvent été associé à la capture dans les filets de pêche, à la modification de la distribution en proies et à la pollution. Néanmoins, l'identification des lésions et des causes de mortalités des mammifères marins en Mer du Nord, par l'intermédiaire d'études pathologiques systématiques, ne sont apparues qu'au début des années 90.

Tous les animaux ont été autopsiés et échantillonnés selon un protocole standard. Des tissus étaient collectés pour les examens histopathologiques, microbiologiques et toxicologiques. De plus, des prélèvements ont également été réalisés de manière à déterminer l'âge et le contenu alimentaire ainsi que pour l'étude des variations génétiques de la population.

Les 55 marsouins étaient répartis en 36 femelles (aucune gestante) et 28 mâles (sexe non déterminé dans un cas) provenant de la côte belge (n = 40) et du nord de la France (n = 15) distribués en six nouveau-nés (≤ 90 cm), 30 immatures (91-130 cm) et 17 adultes (> 130 cm). L'âge n'a pu être déterminé dans deux cas. La répartition temporelle des échouages était très hétérogène. En effet, de 1990 à 1995, cinq individus avaient été examinés tandis que par la suite ils n'ont cessé d'augmenter, atteignant 27 marsouins en 1999 (Figure 2).

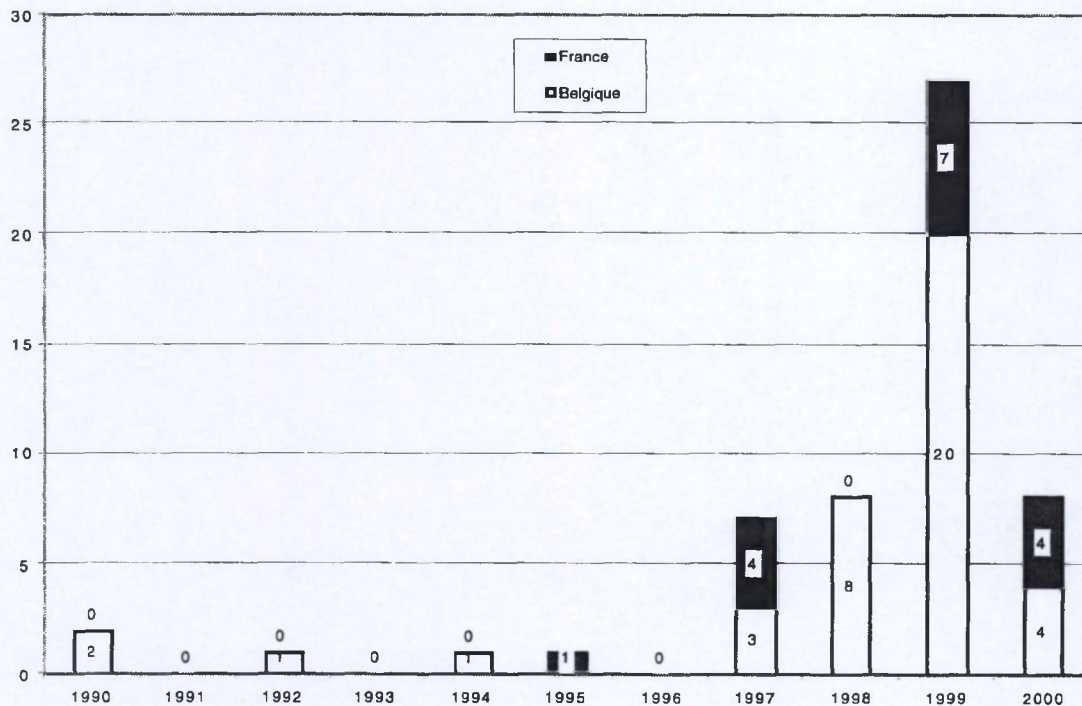


Figure 2 : Répartition annuelle des échouages de marsouins sur le littoral belge et du nord de la France entre 1990 et 2000.

Dans 16 cas, le mauvais état de conservation de la carcasse n'a pas permis de réaliser une autopsie complète.

A l'autopsie, les principales lésions étaient de l'émaciation sévère, de la broncho-pneumonie et des parasitoses sévères multiples (Tableau 7, discussion générale). Fréquemment, plusieurs lésions fatales étaient présentes sur le même individu.

L'émaciation se caractérisait par une amyotrophie généralisée et une réduction de l'épaisseur de lard sous-cutané ($9,2 \pm 3,8$ mm pour les individus émaciés ; $20,1 \pm 10,7$ mm pour les individus non-émaciés).

La broncho-pneumonie était le plus souvent aiguë, hémorragique à purulente, voire nécrosante dans certains cas. Des infestations parasitaires par *Pseudalius inflexus*, *Torynurus convolutus* et *Halocercus* sp. étaient fréquemment associés à ces lésions pulmonaires. Les germes isolés étaient *E. coli*, *Staphylococcus* sp. non hémolytique, *Aeromonas hydrophyla* et *Proteus vulgaris*. *Pseudomonas* sp. a été isolé dans tous les cas de pneumonie aiguë nécrosante.

Les parasitoses sévères et multiples se caractérisaient par des infestations sévères de plusieurs organes qui présentaient des lésions associées. Ainsi, comme précédemment décrit, de la broncho-pneumonie aiguë était souvent associée à l'infestation mixte par *P. inflexus* et *T. convolutus* ; *P. inflexus*, se localisant également au niveau de la petite circulation artérielle était responsable d'un cas de thrombose chronique. De la gastrite aiguë ulcéralive était associée à l'infestation par *A. simplex* dont les larves se fixent à la muqueuse gastrique. Les infestations sévères par les douves (*Campula oblonga*) provoquaient de la périangiocholite chronique sévère prenant parfois l'aspect d'hépatite chronique interstitielle étendue. Ces parasitoses multiples s'accompagnaient fréquemment d'une infestation sévère de l'oreille moyenne (sinus périmyrtanique et bulle tympanique) par *Stenurus minor*, sans évidence de lésion macroscopique.

D'autres lésions et causes de mortalités ont été observées avec une moindre incidence. La capture dans les filets de pêche était responsable de la mort de huit marsouins. Quatre individus ont été directement rapportés par des pêcheurs, tandis que dans les 4 autres cas, l'absence de lésion fatale à l'exception d'oedème pulmonaire accompagné de congestion et d'emphysème, et la présence d'incisions cutanées nettes et fines ont permis d'établir le diagnostic. Un marsouin ramené par un pêcheur a été considéré comme étant mort avant la mort. En effet, il présentait de nombreuses lacérations cutanées non hémorragiques ainsi que de l'émaciation et de la broncho-pneumonie aiguë. Les lésions ulcéralives et multiples du tractus digestif étaient fréquentes telles que de la stomatite aiguë ulcéralive et de l'oesophagite aiguë à chronique ulcéralive.

A l'examen microscopique, les lésions pulmonaires se distribuaient principalement en trois catégories. De la broncho-pneumonie interstitielle se caractérisait par un infiltrat péribronchique de lymphocytes et un épaissement des septa alvéolaires par de l'oedème, des macrophages, des lymphocytes et de rares éosinophiles et cellules géantes. Cette réaction était le plus fréquemment associée à la présence de nématodes adultes dans les voies respiratoires. Le second type de réaction prenait l'aspect d'une broncho-pneumonie aiguë avec présence d'exsudat composé de neutrophiles, d'érythrocytes et de fibrine dans les voies respiratoires et présence de neutrophiles dans le parenchyme pulmonaire. Dans les cas sévères, de larges plages de parenchyme nécrosé étaient visibles. Ce type de réaction était le plus souvent disposé autour de larves de nématode et accompagné de foyers de prolifération bactérienne. La troisième catégorie de lésion pulmonaire se caractérisait par une congestion généralisée avec présence dans

le parenchyme et les voies respiratoires d'oedème contenant parfois des érythrocytes. Cette réaction était présente chez les animaux morts dans les filets de pêche.

Les lésions ulcératives muco-cutanées se présentaient sous la forme de réaction subaiguë à chronique avec un infiltrat de macrophages et de fibroblastes ainsi que des évidences de néovascularisation dans le tissu conjonctif sous-jacent.

Plusieurs formes d'encéphalites ont été diagnostiquées sous le microscope. Dans un cas, une encéphalite subaiguë granulomateuse se caractérisait par des collections périvasculaires de macrophages et de lymphocytes, ainsi que de grandes plages de nécrose cérébrale massivement infiltrées par des macrophages. Des corps d'inclusion éosinophiles intranucléaires étaient disséminés dans la lésion. Un cas de méningo-encéphalite subaiguë périvasculaire accompagnait la présence d'oeufs semblables à ceux de trématodes.

Aucun virus n'a pu être mis en évidence tant par immunohistochimie que par culture cellulaire. De plus, tous les *sera* testés étaient négatifs pour *Brucella abortus*.

Conclusions

Les principales observations relevées à l'autopsie des marsouins échoués sur le littoral belge et du nord de la France sont l'émaciation, la parasitose sévère et multiple et la broncho-pneumonie aiguë. Ces différentes lésions sont souvent présentes simultanément et sont étroitement liées. Le processus fatal peut être schématisé de la manière suivante : l'émaciation et la parasitose sévère et multiple sont des maladies chroniques qui conduisent l'animal à une débilitation progressive favorisant une broncho-pneumonie aiguë, cause de la mort.

Un fait majeur de cette étude est l'augmentation importante du nombre de marsouins échoués ces dernières années. Aucune épizootie d'origine infectieuse n'a pu être identifiée comme en étant l'origine, pas plus qu'une incidence plus élevée de capture dans les filets de pêche. Il est vraisemblable que le nombre de marsouins ait augmenté dans la baie sud de la Mer du Nord suite à un déplacement de la population. Cette hypothèse permettrait d'expliquer le déclin de marsouins dans certaines parties septentrionales de la Mer du Nord et l'apparition de l'espèce dans des zones plus méridionales où elle était considérée comme rare.

3.2. Infection par un morbillivirus chez les phoques communs échoués sur le littoral belge et du nord de la France durant l'été 1998

Morbillivirus in common seals stranded on the coasts of Belgium and northern France during summer 1998

The Veterinary Record, **148**, 587-591, 2001

Le but de cette étude était d'identifier les lésions et les causes de mortalité lors d'un épisode de mortalité soudaine et sévère de phoques communs sur les côtes belges et du nord de la France. Durant le mois d'août 1998, 16 phoques se sont échoués, morts ou moribonds, ces derniers étant hospitalisés dans des centres spécialisés de soins. En tout, 11 phoques (10 juvéniles et 1 adulte) ont été autopsiés et échantillonnés selon leur état de fraîcheur pour les examens histopathologiques, microbiologiques et toxicologiques. Les cinq individus morts dans les centres de soins ont été examinés quelques heures après la mort, les autres étaient plus ou moins bien conservés.

De l'hyperthermie biphasique, de l'émaciation, de la pneumonie furent les principaux signes cliniques observés chez les animaux hospitalisés.

A l'autopsie, les lésions les plus fréquemment présentes étaient de l'émaciation, de la broncho-pneumonie aiguë avec de l'emphysème interstitiel ainsi que de l'entérite aiguë.

A l'examen microscopique, la lésion la plus fréquente était de la broncho-pneumonie subaiguë caractérisée par un infiltrat de lymphocytes, de macrophages et rares neutrophiles dans le tissu interstitiel. Dans un cas, la broncho-pneumonie était sévère, aiguë et nécrosante. Le tissu lymphoïde était fortement déplété avec une absence de formation de follicules lymphoïdes et de nombreux lymphocytes avec un noyau pycnotique. De rares corps d'inclusion éosinophiles étaient présents dans le noyau de certains lymphocytes. Un cas de méningo-encéphalite aiguë a également été observé.

Suite à l'examen clinique, nécropsique et microscopique, une morbillivirose a été fortement suspectée. Pour étayer ce diagnostic, des examens complémentaires ont été réalisés.

L'examen par immunofluorescence, utilisant un anticorps polyclonal anti-CDV, était positif pour deux individus et des titres d'anticorps neutralisants anti-CDV ont été détectés chez six phoques.

Un examen immunohistochimique a été réalisé en utilisant deux anticorps monoclonaux, un dirigé contre la protéine de fusion du CDV (clone 1C5) et l'autre contre l'hémagglutinine du PDV (clone 1,3). Des tissus d'un phoque sain ainsi que des tissus d'un dauphin et d'un rorqual commun infectés par le morbillivirus ont été utilisés respectivement comme témoins négatif et positif. Une réaction positive a été obtenue sur du tissu lymphoïde de quatre phoques (Etude 2, figure 2).

Des suspensions de tissus positifs à l'examen par immunofluorescence ont été groupées et ont été utilisées pour infecter des cultures de cellules Vero. Des particules virales de type paramyxovirus ont été identifiées par microscopie électronique après coloration négative.

Finalement, un test de diagnostic par RT-PCR a été réalisé. De l'ARN a été extrait de tissus congelés ainsi que de tissus fixés au formol et enrobés à la paraffine. Les amorces sélectionnées amplifient un fragment de 78 pb du gène de la phosphoprotéine P. Du ganglion lymphatique fixé au formol et enrobé à la paraffine d'un rorqual infecté par le morbillivirus a été utilisé comme témoin positif, et une RT-PCR pour la β -actine a été effectuée pour contrôler l'extraction de l'ARN. Des fragments de la taille attendue ont été obtenus, à partir des échantillons congelés et de ceux qui étaient enrobés à la paraffine, de sept phoques y compris deux dont la carcasse était dans un mauvais état de conservation (Etude 2, figure 3). L'amplification était également positive pour la β -actine.

Conclusions

Cette étude démontre que la mortalité et les lésions observées chez les phoques échoués sur les côtes belge et du nord de la France durant l'été 1998 sont à mettre en rapport avec une infection par un morbillivirus. Ce diagnostic se base sur les évidences qui peuvent être résumées comme suit :

- Examen immunohistochimique positif chez quatre phoques ;
- Titres d'anticorps neutralisants anti-CDV détectés chez six phoques ;
- Amplification d'un fragment du gène de la phosphoprotéine chez sept phoques.

Ce diagnostic est confirmé par l'identification de particules virales de type paramyxovirus dans des cultures cellulaires.

Bien que des évidences sérologiques suggéraient que le morbillivirus du phoque était toujours présent en Mer du Nord depuis l'épizootie de 1988 (responsable de la mort d'environ 18.000 phoques), il semble que ce soient les premiers cas de maladie et de mortalité depuis lors. Les signes cliniques, et les lésions macroscopiques et microscopiques sont similaires à ceux précédemment décrits chez les phoques infectés par ce virus. L'avantage de la RT-PCR, par

l'amplification d'un fragment d'ARN de petite taille est de pouvoir établir un diagnostic lorsque les examens histologiques et immunohistologiques ne sont plus réalisables sur une carcasse en état avancé de putréfaction. En effet, dans notre étude, sept phoques étaient positifs par la RT-PCR, mais seuls deux individus étaient positifs suite à l'examen immunohistochimique.

3.3. Lésions et causes de mortalité des phoques échoués sur le littoral belge et du nord de la France entre 1990 et 2000

*Lesions and causes of death of seals stranded on the coasts of Belgium and northern France
from 1990 to 2000*

Article soumis pour publication

Très peu de publications scientifiques ont été consacrées aux lésions et aux causes de mortalités des pinnipèdes en Mer du Nord, et ce jusqu'à la fin des années quatre-vingt. A ce moment, de très nombreux articles ont été consacrés à la première épizootie par le PDV, en 1988. En effet, entre 1988 et 1989, environ 18.000 phoques communs sont morts en Mer du Nord sur une population estimée à 25.000 individus. Depuis lors, d'autres espèces ont été infectées comme le phoque gris, le phoque du lac Baïkal et le phoque de la Caspienne. Bien que des phoques séropositifs soient toujours présents, aucun cas de maladie associée à l'infection par le PDV n'a été rapportée dans la population de la Mer du Nord depuis l'épizootie de 1988. Cependant durant l'été 1998, cette maladie fut diagnostiquée sur sept phoques juvéniles échoués sur les côtes belge et du nord de la France. Néanmoins, en dehors de cet intérêt pour les infections par le morbillivirus, la presse scientifique est peu abondante pour les autres causes de mortalité.

Les buts de cette étude étaient d'identifier les lésions, leurs origines et les causes de mortalité sur les phoques échoués sur le littoral belge et du nord de la France de 1990 à 2000. Trois espèces de phoques ont été considérées : le phoque commun, le phoque gris et le phoque à capuchon. Seule la première espèce a été prise comme animal de référence. L'inventaire des lésions et son corollaire, à savoir les causes de mortalité, a permis de mieux connaître l'état de santé de la population de cette espèce la plus fréquente le long de notre littoral en identifiant les principales menaces. Ainsi, un modèle pathogénique devait être établi permettant d'expliquer les mécanismes morbides responsables des mortalités de phoques dans la baie sud de la Mer du Nord.

La répartition temporelle des échouages est très hétérogène. En effet, entre 1990 et 1997, seuls six phoques étaient disponibles pour l'autopsie, contre 32 de 1998 à 2000 (Figure 3).

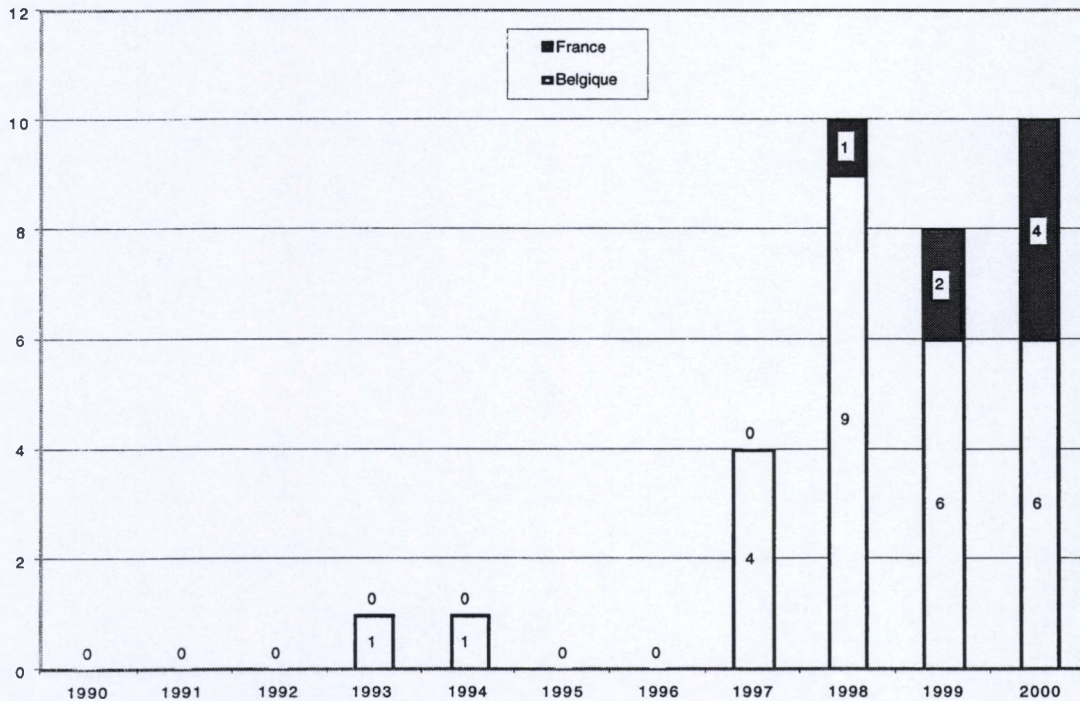


Figure 3 : Répartition annuelle des échouages de phoques communs sur le littoral belge et du nord de la France entre 1990 et 2000

En tout, 38 phoques (34 phoques communs, 3 phoques gris et 1 phoque à capuchon) ont été autopsiés et échantillonnés selon un protocole standard. Il s'agissait de 26 juvéniles, 10 adultes (âge non déterminé dans deux cas) répartis en 20 mâles et 15 femelles (sexe non déterminé dans trois cas). Dans 31 cas, les animaux étaient trouvés morts sur la plage et sept étaient décédés pendant la période de réhabilitation au *National Sea Life* de Blankenberge. Des tissus étaient collectés pour les examens histopathologiques, microbiologiques et toxicologiques. Dans 14 cas, l'examen nécropsique fut limité suite à l'état avancé de putréfaction.

Les observations nécropsiques figurent dans le tableau 5

Onze présentaient de l'émaciation avec une réduction sévère des réserves adipeuses et une amyotrophie. L'épaisseur de lard dorsal variait selon :

- le statut nutritionnel (émacié : 3,9 mm ± 4,8 ; non-émacié : 23,2 mm ± 6,8 ; p < 0,0001) ;
- le processus morbide (processus mortel aigu : 23,0mm ± 7,7 ; processus mortel chronique : 7,0 mm ± 8,9 ; p = 0,001) ;
- l'âge (juvénile : 8,5mm ± 9,2 ; adulte : 22,0 mm ± 11,1 ; p = 0,016).

Au niveau pulmonaire, la lésion la plus fréquente était la broncho-pneumonie aiguë, associée dans quelques cas à de la verminose par *Otostrongylus circumlitus* et *Parafilaroides* sp. dans les bronches (5 cas) et par *O. circumlitus* dans l'artère pulmonaire (deux cas).

En cas de capture dans les filets, les poumons apparaissaient congestifs et oedématisés avec de la mousse blanche abondante parfois marquée de sang dans les voies respiratoires.

Au niveau digestif, de l'entérite aiguë hémorragique a été observée dans six cas. Deux individus présentaient de la péritonite aiguë fibrineuse étendue consécutive à une perforation gastrique par un corps étranger. Dans les deux cas, il s'agissait de baguette métallique utilisée sur les lignes de pêche pour les écarter les unes des autres.

	Phoque commun (n=20)	Phoque gris (n=3)	Phoque à capuchon (n=1)	Total (n=24)
Emaciation	11			11
Broncho-pneumonie aiguë	6		1	7
Entérite aiguë	6			6
Evidence de traumas	2	2		4
Oedème et congestion pulmonaires	5	2		7
Péritonite aiguë	2			2
Pleurésie aiguë	1			1

Tableau 5 : Lésions observées sur les phoques échoués sur les côtes belge et du nord de la France entre 1990 et 2000

De nombreux hématomes sous-cutanés et musculaires ont été observés sur la tête et le thorax de deux phoques communs et de deux phoques gris. Dans deux cas, ces lésions accompagnaient des fractures de côtes et étaient également associées à un hémithorax bilatéral et des hématomes intercostaux.

A l'examen microscopique, trois catégories principales de lésions étaient visibles au niveau pulmonaire : de la broncho-pneumonie aiguë, le plus souvent nécrosante ; de la pneumonie interstitielle subaiguë accompagnée d'infiltrats d'éosinophiles et de péribronchite subaiguë lors d'infestation parasitaire ; de l'oedème et de la congestion pulmonaires (dans les cas de capture dans les filets).

Au niveau des ganglions lymphatiques, les principales observations étaient d'une part de l'adénite subaiguë granulomateuse fréquemment organisée autour d'une matrice éosinophile anhyste (réaction de Splendore-Hoeppli). D'autre part, de la déplétion lymphoïde était souvent visible.

Deux individus présentaient de la méningo-encéphalite aiguë à subaiguë avec des plages de nécrose et d'hémorragie disséminées ainsi que des agrégats périvasculaires de lymphocytes et de macrophages.

Des bactéries ont été isolées du sang, la moelle osseuse ou de l'encéphale chez six phoques, suggérant ainsi une bactériémie ou une septicémie.

Les résultats des investigations pour mettre en évidence une infection par un morbillivirus sont résumés dans le tableau 6 qui rassemble tous les animaux positifs entre 1990 et 2000. En plus des sept phoques infectés par le morbillivirus durant l'été 1998 (Etude 2), cinq autres phoques se sont révélés positifs par RT-PCR. Dans deux cas, l'infection a été confirmée par d'autres méthodes :

- Immunofluorescence (anticorps polyclonal anti-CDV) dans le tissu pulmonaire (n=1) ;
- Mise en évidence de particules virales de type paramyxovirus après coloration négative de cultures cellulaires (cellules Vero infectées avec une suspension de tissu pulmonaire) (n=1) ;
- Evidence immunohistochimique spécifique (anticorps monoclonal PDV 1,3) dans des lymphocytes spléniques (n = 1) ainsi que dans le ganglion bronchique, l'amygdale et le tissu pulmonaire (n = 1).

Deux catégories de causes de mortalité peuvent être aisément identifiées suite aux examens *post mortem* réalisés sur les phoques échoués entre 1990 et 2000 le long des côtes belges et du nord de la France. D'une part, les mortalités associées à un processus morbide chronique, les animaux étant émaciés et présentant des évidences de processus infectieux (broncho-pneumonie aiguë, entérite, septicémie), le plus fréquemment associés à une infection par un morbillivirus. D'autre part, les mortalités associées à un processus morbide aigu, soit suite à la capture dans des filets de pêche, soit d'origine traumatique.

Etat de carcasse	Date d'échouage	Poids (kg)	Taille (cm)	Observations macroscopiques	Observations microscopiques	IF	CC	SN	IHC	RT-PCR	
										Tissus congelés	Tissus FF-EP
2	30/07/98	8	92	Emaciation, entérite, pneumonie	Pneumonie interstitielle subaiguë	+	+	1/8	+: R	+: P, R, G	+: G
4	12/08/98	8,5	97	Emaciation	-	-	NE	1/8	-	+: P	NE
2	26/08/98	11,5	100	Emaciation	Pneumonie interstitielle subaiguë	-	NE	NE	+: G	+: P, R	-
2	09/08/98	12,5	93,5	Emaciation, pneumonie	Broncho-pneumonie nécrosante aiguë à subaiguë, méningo-encéphalite aiguë à subaiguë	+	+	1/128	+: G, T	+: P, R, G	+: E, G
2	09/08/98	12,6	100	Emaciation, entérite, pneumonie	Pneumonie interstitielle subaiguë	-	+	1/16	+: G, R	+: P, R	+: E, G
2	14/08/98	-	-	Emaciation	-	NE	NE	1/20	NE	+: P	NE
4	14/08/98	11,5	-	Emaciation	-	NE	NE	NE	NE	+: P, R	NE
2	31/01/99	43	138	Congestion et emphysème pulmonaires, entérite	Congestion pulmonaire	NE	NE	NE		+: P, R	-
2	26/07/99	7,4	82	Emaciation, congestion et emphysème pulmonaires	méningo-encéphalite aiguë à subaiguë, congestion pulmonaire	+	+	NE	+	NE	+: E, G
2	16/10/99	13,5	106	Emaciation, entérite, pneumonie	Congestion pulmonaire	NE	NE	NE	NE	NE	+: P, G
2	29/12/99	13	95	Emaciation, pneumonie	Broncho-pneumonie nécrosante aiguë	NE	NE	NE	+	+: P, R, G	+: P, R
2	12/03/00	25	121	pneumonie	Broncho-pneumonie aiguë	NE	NE	NE	NE	+: P, R	+: P, R

Tableau 6 : Résultats des investigations *post mortem* réalisées sur les 12 phoques diagnostiqués infectés par un morbillivirus suite à l'examen immunohistochimique et/ou par RT-PCR ; Etat de carcasse : 2 : très frais ; 4 : putréfaction ; IF : immunofluorescence ; SN : séroneutralisation ; IHC : immunohistochimie ; Tissus FF-PE : tissus fixés au formol et enrobés à la paraffine ; NE : non effectué ; R : rate ; P : poumon ; G : ganglion lymphatique ; E : encéphale ; * tissus rassemblés ; + : résultat positif ; - : résultat négatif.

3.4. Investigations *post mortem* réalisées sur les cachalots échoués sur le littoral belge et hollandais

Postmortem investigations on winter stranded sperm whales from the coasts of Belgium and the Netherlands

Journal of Wildlife Diseases, 34, 99-109, 1998

L'objectif de cette étude est de décrire les lésions observées et leurs origines respectives sur sept cachalots lors de deux échouages massifs (hiver 94-95). De nombreuses hypothèses tentent d'expliquer ces accidents où plus de deux cétacés s'échouent simultanément, au même endroit. Cependant, individuellement, une seule de ces théories ne permet pas d'expliquer ces échouages massifs. Il est probable qu'il s'agisse d'interaction entre les contraintes océanographiques du littoral (marée, topographie complexe,...) et des données propres aux animaux (comportement pélagique, structure sociale forte, état de santé,...). Par l'analyse réalisée, nous avons voulu développer une hypothèse d'échouage des cachalots applicable à la baie sud de la Mer du Nord. Bien que ces échouages soient décrits depuis le XVI^e siècle dans cet écosystème, aucune étude pathologique n'avait jamais été publiée pour mieux comprendre le mécanisme morbide et fatal. Une des premières raisons est la taille de ces animaux, atteignant fréquemment 15 mètres pour un poids supérieur à 30 tonnes et qui viennent s'échouer sur nos plages en groupe de 3 à 18 individus. Les seules données pathologiques existantes concernent les cachalots capturés lors des opérations de chasse.

Deux groupes de cachalots ont été découverts échoués morts ou vivants sur le littoral belge (Coxyde) et hollandais (Scheveningen), respectivement le 18 novembre 1994 et le 12 janvier 1995. Les animaux vivants sont morts quelques heures après l'échouage et les sept cachalots ont été autopsiés et échantillonnés directement sur les plages moins de 24 h après la mort. Les animaux de la côte belge ont été pesés lors de l'équarrissage.

Tous les individus étaient des mâles, adultes, d'environ 15 mètres de long. A l'autopsie, les principales lésions étaient des abrasions cutanées *peri mortem*, de la stomatite aiguë ulcérate, de l'otite externe aiguë à chronique ulcérate et de la congestion généralisée de la séreuse intestinale et du mésentère parfois accompagnée de pétéchies. La stomatite, présente dans cinq cas, se caractérisait par la présence de 3 à 4 ulcères aigus, atteignant 10 cm pour les plus grands, disposés longitudinalement sur le palais dur. Dans les cas d'otite, des ulcères de 1 à 4 cm de long étaient situés dans le tiers externe du conduit auditif. Les animaux étaient dans un

mauvais état d'embonpoint, l'épaisseur de graisse dorsale étant d'environ 16 cm pour les animaux échoués à Coxyde et inférieure à 12 cm pour les animaux échoués à Scheveningen. De plus, aucun ne présentait de graisse viscérale. Finalement, les animaux échoués à Coxyde présentaient un important déficit pondéral.

A l'exception de quelques becs de céphalopodes dans l'estomac, il n'y avait pas de contenu alimentaire dans le tube digestif. L'analyse de ces becs a permis d'identifier les espèces comme étant des céphalopodes de l'Atlantique nord, qui ne sont pas présents en Mer du Nord.

Les examens microscopiques ont permis de caractériser les ulcères du palais comme étant de la stomatite aiguë à subaiguë ulcéralive profonde avec une nécrose étendue du tissu conjonctif sous-jacent accompagnée de dermatite aiguë à subaiguë périvasculaire. Les cellules épithéliales présentaient un oedème intracellulaire (*ballooning degeneration*) ainsi que des corps d'inclusion éosinophiles intracytoplasmiques. Les lésions du conduit auditif ont été diagnostiquées comme de l'otite aiguë à subaiguë ulcéralive.

Les lésions ulcéralives évoquaient une infection virale. En effet, l'épithélium présentait de la spongiose et de la dégénérescence hydropique et dans certains cas, des inclusions intracytoplasmiques étaient légèrement positives à la coloration de Feulgen, spécifique pour l'acide nucléique. Néanmoins, les examens par microscopie électronique et par immunohistochimie ainsi que par culture cellulaire sont restés négatifs. Aucun germe significatif n'a été mis en évidence suite aux différents examens bactériologiques et parasitologiques.

Conclusions

Deux catégories principales d'observations sont significatives à l'issue des autopsies. D'une part celles qui étaient présentes avant l'échouage des cachalots (lésions ulcéralives des épithéliums et mauvais état d'embonpoint) et qui ont peut-être participé à l'évènement. D'autre part, celles qui ont été provoquées par l'échouage (abrasions cutanées et congestion viscérale). Le mauvais état d'embonpoint, l'absence de proies fraîches dans le tractus digestif et la présence de becs de céphalopode de l'Atlantique suggèrent que ces animaux ne s'étaient plus alimentés adéquatement depuis leur arrivée en Mer du Nord.

Connaissant le comportement des cachalots, les données océanographiques des zones où ils se sont échoués et les lésions similaires observées entre les différents individus, une hypothèse peut être avancée pour expliquer ces échouages massifs. Les cachalots sont des animaux pélagiques vivant au large sans pénétrer en Mer du Nord. Dans l'Atlantique nord-est, les mâles effectuent des migrations saisonnières depuis les eaux froides du nord vers le sud en passant au large de l'Ecosse. Pour une raison non définie, lors de cette migration hivernale, certains pénétreraient en Mer du Nord. Dans sa partie septentrionale, la profondeur des eaux est supérieure à 100 m mais dans sa partie méridionale, elle dépasse rarement 25 m. De plus, dans

cette zone, la topographie marine est très complexe avec de nombreux bancs de sable. Les cachalots se retrouvent dans un environnement qui ne leur pas familier, dans lequel leurs proies ne sont pas présentes. Progressivement, ils s'amaigrissent et s'affaiblissent, sont sujets processus infectieux secondaires et certains se retrouvent prisonniers de bancs de sable à marée descendante. Hors de l'eau, les altérations vasculaires engendrent un processus de *shock*, responsable de la mort de l'animal. A l'échelle des cachalots, la Mer du Nord représente un piège, un cul-de-sac dont ils ont très peu de chances d'échapper.

3.5. Lésions observées chez deux rorquals (*Balaenoptera physalus*) associées à une infection par un morbillivirus.

*Pathological findings in two fin whales (*Balaenoptera physalus*) with evidence of morbillivirus infection*

Journal of Comparative Pathology, **123**, 198-201, 2000

Le but de cette étude était d'identifier les lésions et les causes de mortalité de rorquals échoués dans la baie sud de la Mer du Nord ainsi que l'intervention d'un morbillivirus dans le processus morbide.

Deux rorquals femelles immatures se sont échoués respectivement le 1^{er} novembre 1997 sur la plage de Raversijde (Belgique) –Baleine 1- et le 9 octobre 1998, sur la plage de Wimereux (France) –Baleine 2-. Dans chacun des cas, une autopsie a été réalisée, complète pour la première et partielle pour la seconde (état intermédiaire de conservation de la carcasse et absence d'équipement lourd pour l'autopsie). De plus, des échantillons ont été collectés pour des investigations histologiques, bactériologiques, virologiques et parasitologiques.

L'examen nécropsique a révélé une infestation cutanée par des copépodes (Penellidae) et un mauvais état nutritionnel. De plus, chez la baleine 1, un thrombus chronique de 75 cm de long et de 20 cm de diamètre était présent dans la veine porte. Il était semi-occlusif et organisé autour de plusieurs centaines de nématodes (*Crassicauda* sp.).

A l'examen histologique, des cellules syncytiales ont été observées dans les ganglions lymphatiques mésentériques et de la glande mammaire (baleine 1), dans les réactions inflammatoires chroniques associées à des infestations parasitaires au niveau du rein (baleine 1) et de la peau (baleine 1 et 2). Les cellules syncytiales contenaient jusqu'à 50 noyaux dont certains présentaient des corps d'inclusion intranucléaires éosinophiles. De plus, les ganglions présentaient une forte déplétion lymphoïde. Un examen immunohistochimique a été réalisé en

présentaient une forte déplétion lymphoïde. Un examen immunohistochimique a été réalisé en utilisant deux anticorps monoclonaux, un dirigé contre l'hémagglutinine du PDV (clone 1,3) et l'autre orienté contre la protéine de fusion du CDV (clone 1C5). La réaction était fortement positive dans les cellules syncytiales présentes dans les ganglions et dans les autres tissus (Baleine 1) et se caractérisait par un feutrage intra-cytoplasmique tandis que les corps d'inclusion apparaissaient fortement colorés et homogènes (Etude 5, figure 1). Certaines cellules mononuclées étaient également colorées, mettant en évidence des corps d'inclusion inaperçus par l'examen histologique (Baleine 1 et 2).

D'autres évidences ont permis de confirmer une infection par un morbillivirus :

- Anticorps neutralisants anti-CDV : titres de 1/64 (baleine 1) et 1/32 (baleine 2)
- Aggrégats intranucléaires de nucléocapsides dans les syncytia (baleine 1) observés par microscopie électronique ;
- Effets cytopathogènes dans des cultures de cellules Vero inoculées par une suspension de tissu hépatique et mise en évidence de particules virales similaires à celles des paramyxovirus, observées après coloration négative par microscopie électronique au départ de la culture cellulaire (baleine 1).

Toutes ces évidences suggèrent que les deux baleines étaient infectées par un morbillivirus. Selon les auteurs, il s'agit de la première description de lésions spécifiques à une telle infection chez les baleines.

La déplétion lymphoïde est à l'origine d'infections secondaires qui, selon notre analyse est à l'origine d'une salmonellose chez la baleine 1.

4. DISCUSSION GENERALE

4.1. Petits cétacés

4.1.1. Lésions et observations post mortem

L'émaciation, la broncho-pneumonie aiguë et le parasitisme sévère étaient les pathologies les plus fréquentes. Ces lésions sont similaires à celles décrites pour les autres pays limitrophes de la Mer du Nord (Baker et Martin, 1992; Kirkwood *et al.*, 1997; Siebert *et al.*, 2001). Néanmoins, leurs fréquences respectives varient en fonction des régions (Tableau 7). Il est commun de diagnostiquer de nombreuses lésions sur le même individu (Baker et Martin, 1992) et parmi celles-ci, il est difficile de déterminer celle qui est responsable de la mort (Siebert *et al.*, 2001).

4.1.1.1. Emaciation

Une observation constante est une épaisseur de graisse des animaux échoués (Benke *et al.*, 1998; Siebert *et al.*, 1999; Siebert *et al.*, 2001) inférieure à celle des animaux pris dans les filets (Read, 1990; Lockyer, 1995). L'émaciation, décrite par Baker et collaborateurs (1992) ainsi que par Kirkwood et collaborateurs (1997), se rapporte à un état de privation alimentaire observé chez les animaux non-sevrés ou chez les animaux âgés ayant des dents usées. Dans notre étude, quatre individus entraient dans ces conditions. Pour les autres individus restants, cette émaciation n'a pas d'explication directe.

	Grande-Bretagne			Allemagne		Belgique-Nord de la France
	Baker et Martin, 1992	Kirkwood <i>et al.</i> , 1997	Jepson <i>et al.</i> , 2000	Benke <i>et al.</i> , 1998	Siebert <i>et al.</i> , 2001	Etude présente
Période d'observation	1979-1991	1990-1995	1990-1996	1991-1993	1991-1996	1990-2000
Diagnostic établi sur	n=41	n=176	n=197	n=61	n=133	n=39
Evidence de capture	24,4 %	37 %	34 %	51 %	46 %	20,5 %
Broncho-pneumonie	26,8 %	16 %	30 %	73 %	56,4 %	66,6 %
Parasitisme	61 %*	-	69 %*	73 %	62,4 %*	61,5 %
Emaciation	7 %**	9 %**	-	41 %	31 %	66,6 %

Tableau 7: Comparaison des principales lésions observées chez les marsouins échoués sur les côtes de la Mer du Nord (autopsie complète). ; * : Parasitisme respiratoire ; ** : décrit comme un état de privation (*starvation*)

Selon Siebert et collaborateurs (1999), cet état pourrait être associé à une réduction des apports alimentaires suite à l'infestation parasitaire. Comme 70 % des animaux analysés présentaient un tube digestif vide, l'émaciation peut également être due à une réduction de l'alimentation. Cette diminution des apports alimentaires pourrait être la conséquence d'ulcérations du tractus digestif antérieur (bouche, oesophage) comme souvent observées dans notre analyse ou d'une réduction des proies pourrait en être l'origine. Néanmoins, cette dernière est peu probable puisque les espèces dont s'alimente le marsouin sont fréquentes dans la baie sud de la Mer du Nord.

4.1.1.2. Broncho-pneumonie

La plupart des cas de broncho-pneumonie surviennent à la suite des complications bactériennes secondaires aux infestations parasitaires pulmonaires. Cette combinaison est la première cause de mortalité infectieuse des marsouins échoués sur les côtes de Grande-Bretagne (Baker et Martin, 1992; Jepson *et al.*, 2000), d'Allemagne (Benke *et al.*, 1998; Siebert *et al.*, 1999; 2001), et des Pays-Bas (van Nie, 1989; García Hartmann, 1997).

Pseudalius inflexus, *Torynurus convolutus* et *Halocercus* sp. étant présents simultanément, il n'est pas possible de déterminer laquelle de ces trois espèces est la plus pathogène. Il semble qu'il y ait une relation entre le stade parasitaire et les lésions. En effet, comme décrit par Howard et collaborateurs (1983), les réactions inflammatoires étaient plus

sévères autour des stades larvaires. La prévalence de verminose respiratoire, de 56 % dans notre étude, est classiquement élevée, atteignant 60 % pour les marsouins échoués sur les côtes hollandaises (van Nie, 1989) et allemandes (Siebert *et al.*, 2001), et jusqu'à 69 % sur les côtes britanniques (Jepson *et al.*, 2000). Ces infestations sévères des voies aériennes et des vaisseaux sanguins pulmonaires peuvent entraver les capacités de plongée et de chasse (Siebert *et al.*, 2001) ou participer à l'émaciation (Siebert *et al.*, 1999)

4.1.1.3. Infestations parasitaires

Comme signalé dans le tableau 7, le parasitisme a souvent été rapporté chez les marsouins sans lésion associée à l'infestation (Read, 1999). Néanmoins, dans notre étude, les charges parasitaires étaient sévères, infestant simultanément plusieurs organes porteurs de lésions macroscopiques et microscopiques. Ainsi, 89 % des marsouins infestés présentaient un parasitisme multiple (au moins deux organes infestés) qui, dans plus de 52 % des cas était responsable de lésions. Cette notion de parasitose multiple n'était pas prise en cause dans de précédentes études, la plupart des auteurs rapportant uniquement, comme exposé dans le chapitre précédent, l'association entre le parasitisme respiratoire et la broncho-pneumonie. Il apparaît clairement que ces infestations parasitaires multiples prédisposent à une débilitation progressive de l'animal.

Les infestations gastriques par *Anisakis simplex* sont fréquemment associées à des ulcérations chroniques du premier compartiment gastrique chez les marsouins (Baker et Martin, 1992; Kirkwood *et al.*, 1997; Siebert *et al.*, 2001), principalement chez les individus échoués (Bratney et Stenson, 1995). La lésion est due à la présence de larves plutôt qu'au nombre de parasites. En effet, les larves L3, présentes dans les proies, sont libérées dans la lumière gastrique et pénètrent la muqueuse et la sous-muqueuse, provoquant les lésions (Howard *et al.*, 1983). Ces derniers sont peu pathogènes, mais peuvent prédisposer à des hémorragies sévères (Kirkwood *et al.*, 1997) ou servir de voie de pénétration pour les germes (Wünschmann *et al.*, 1999a). La prévalence d'infestation par *A. simplex* est relativement variable en fonction des régions et, selon Baker (1992), cette variabilité révélerait une différence dans l'abondance d'hôtes intermédiaires.

L'infestation de l'oreille moyenne par *Stenurus minor* est fréquente, aussi bien chez les individus échoués (Baker et Martin, 1992; Siebert *et al.*, 2001), que capturés dans les filets (Stroud et Roffe, 1979), sans qu'aucune lésion n'y soit associée (Measures, 2001). Cependant, Siebert et collaborateurs (2001) rapportent un cas d'otite externe de la cavité péribullaire. De plus, il a été suggéré que ces nématodes puissent interférer avec les capacités d'écholocation et de navigation (Howard *et al.*, 1983).

4.1.1.4. Capture dans les filets

La capture dans les filets est moins fréquente dans nos investigations par rapport aux autres côtes limitrophes à la Mer du Nord (Tableau 7). Ainsi, elle est considérée comme la première cause de mortalité des marsouins, atteignant des taux de 24 à 50% selon les pays (Baker et Martin, 1992; Kuiken *et al.*, 1994a; Kirkwood *et al.*, 1997; Siebert *et al.*, 2001). Dans notre étude, seuls quatre marsouins ont été directement fournis par des pêcheurs. En utilisant les critères diagnostiques de capture dans les filets (Kuiken, 1996a), quatre autres individus ont pu être identifiés. Ainsi, on peut considérer que 20,5 % des marsouins échoués sur notre littoral (pour lesquels un diagnostic nécropsique a pu être établi), ont été capturés dans un filet. La situation est fort semblable aux Pays-Bas –20 %- (Addink et Smeenk, 1999). Néanmoins, parmi ces huit cas, un marsouin amené par un pêcheur, présentait des lacérations cutanées profondes typiques de la prise dans un filet mais sans aucune hémorragie ou congestion sous cutanée associée, suggérant qu'il était mort avant la capture. De plus, de nombreuses lésions, y compris de la broncho-pneumonie aiguë et de l'émaciation étaient visibles à l'autopsie.

Les plus faibles taux rapportés pour la Belgique et les Pays-Bas seraient à mettre en relation avec l'utilisation plus fréquente de chaluts dans ces régions (García Hartmann *et al.*, 1996; Reijnders *et al.*, 1996). En effet, l'ouverture verticale du chalut est très petite (< 1 m) comparée aux autres types d'engins de pêche, limitant d'autant les captures (Couperus, 1997), les cétacés étant plus fréquemment capturés dans des filets de type maillant (Northridge, 1992). Un seul pêcheur belge dispose de l'équipement nécessaire pour l'installation de ce type de filet sur une longueur de 12 km de long.

4.1.1.5. Morbillivirose

Aucune évidence sérologique, microscopique et immunohistochimique d'infection par un morbillivirus n'est apparue sur la population de marsouins échoués entre 1990 et 2000 sur le littoral belge et du nord de la France. En 1988, des lésions caractéristiques avaient été rapportées chez des marsouins échoués sur les côtes britanniques (Kennedy *et al.*, 1988a; 1991; 1992a) et hollandaises (Visser *et al.*, 1993b). Depuis lors, les examens sérologiques ont confirmé que l'infection a persisté dans la population de marsouins sur les côtes allemandes et britanniques (Müller *et al.*, 2000; van Bresseem *et al.*, 2001). Néanmoins, aucune maladie ne semble être associée à cette séropositivité (Siebert *et al.*, 2001). Selon Van Bresseem et collaborateurs (2001), il y aurait une réduction de la prévalence de marsouins séropositifs en Atlantique nord-est (y compris la Mer du Nord). Cette réduction suggère que le DMV n'est pas endémique dans la population et il est possible que le marsouin, ayant perdu son immunité vis-à-vis du DMV, redevienne sensible à une nouvelle introduction de morbillivirus (van Bresseem *et al.*, 2001).

4.1.2. Analyses toxicologiques

Les analyses comparatives préliminaires entre les concentrations en métaux lourds et les lésions observées chez les marsouins échoués sur nos côtes entre 1990 et 2000 suggèrent une concentration élevée en certains métaux et plus particulièrement en zinc hépatique et rénal chez les animaux les plus émaciés (Das *et al.*, 2001b). Néanmoins, la relation entre les deux processus n'est pas encore établie. En effet, l'émaciation permet un accroissement de la concentration tissulaire en certains métaux mais à l'inverse, l'exposition à des taux élevés de ces métaux pourrait prédisposer à la débilitation.

L'exposition chronique aux métaux lourds et aux organochlorés pourrait également prédisposer les cétacés aux maladies infectieuses, mais les études réalisées sur les animaux échoués ne sont pas encore concluantes (Kuiken *et al.*, 1994a; Jepson *et al.*, 1999; Siebert *et al.*, 1999). Selon Kuiken et collaborateurs (1994), il n'y avait aucune différence de concentration de PCBs entre animaux morts de processus traumatiques et ceux qui sont morts d'une maladie infectieuse. Cependant, Jepson et collaborateurs (1999), réalisant une étude similaire sur la même population, ont démontré des concentrations plus élevées chez les animaux morts de maladies infectieuses. De plus, Bennett et collaborateurs (2001) ont mis en évidence des concentrations plus élevées en métaux lourds dans le foie de ces marsouins morts d'une maladie infectieuse. Pour Siebert et collaborateurs (1999), la sévérité des lésions pulmonaires peut être corrélée avec les concentrations en mercure. L'accentuation du parasitisme et des lésions associées à l'âge pourrait être associée à une sénescence du système immunitaire des individus les plus âgés, ou être une conséquence de la débilitation progressive des individus. En effet, l'émaciation peut prédisposer à des altérations de l'immunité cellulaire (Rote, 1994).

4.1.3. Causes de la mort et impact des activités humaines

De nombreuses lésions ont été observées simultanément sur les marsouins que nous avons analysés. Cette prévalence élevée a également été rapportée par Baker (1992) qui signale une moyenne de 7,2 lésions par marsouin. Un modèle pathogénique a été établi entre ces lésions afin de mettre en évidence leurs relations permettant d'expliquer le processus morbide responsable de la mortalité de marsouins échoués sur les côtes continentales de la baie sud de la Mer du Nord et ce, durant la période considérée.

Ainsi, différentes corrélations ont été mises en évidence entre les lésions. La broncho-pneumonie était significativement associée à l'émaciation, ainsi qu'au parasitisme sévère (respectivement $p = 0,01$ et $p < 0,0001$, selon un test exact de Fisher); par contre,

l'émaciation n'était pas associée au parasitisme (Jauniaux, données non publiées). Le parasitisme sévère et multiple ainsi que l'émaciation sont des processus chroniques longs tandis que la broncho-pneumonie est un processus aigu, plus rapide. Dès lors, ces processus chroniques prédisposent à un processus de débilitation progressive, favorisant la broncho-pneumonie qui, dans un stade ultime, est responsable de la mort (Figure 4).

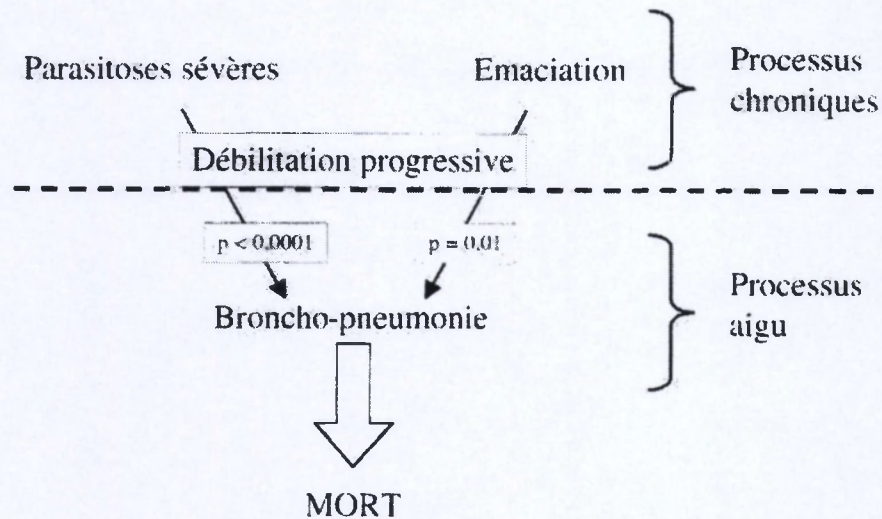


Figure 4 : Représentation schématique du processus morbide de la plupart des marsouins échoués sur le littoral belge et du nord de la France, au départ des principales lésions et de leurs interactions.

Les broncho-pneumonies sont une des premières causes de mortalité des petits cétacés (Baker, 1992b; Measures, 2001) et, jusqu'à présent, le seul élément considéré en association étaient les verminoses respiratoires (Baker et Martin, 1992; García Hartmann, 1997; Jepson *et al.*, 2000; Siebert *et al.*, 2001). Dans notre étude, environ 50 % des marsouins présentaient cette trilogie fatale et se distribuaient en deux catégories de taille, d'une part des individus juvéniles aux alentours de 110 cm et d'autre part des individus âgés, aux alentours de 150 cm. L'origine de cette émaciation et de cette parasitose multiple sévère est vraisemblablement multifactorielle.

Les animaux considérés pris dans les filets constituent un échantillon intéressant pour illustrer l'importance réelle des lésions et de leur relation avec la mortalité au sein de la population. Pour ce faire, nous pouvons identifier les lésions non associées à la capture parmi les animaux capturés dans les filets ou considérés comme tels suite à l'examen nécropsique. Ainsi, Kirkwood et collaborateurs (1997) signalent que la plupart des animaux pris dans les filets étaient en bon état de santé avec un embonpoint normal tandis que Jepson et collaborateurs (1999) rapportent que deux marsouins sur un total de 33 individus capturés

présentaient de la pneumonie. Cette quasi-absence de lésions et un bon état d'embonpoint figurent parmi les facteurs favorables au diagnostic de capture (Kuiken, 1996a). Cependant, dans notre étude, sur les huit individus considérés capturés dans les filets, quatre étaient émaciés dont deux présentaient de la parasitose multiple responsable d'une broncho-pneumonie. Dans un cas, le marsouin fut considéré comme étant mort avant la capture bien qu'il s'agissait d'un individu directement ramené par un pêcheur. Finalement, 11 % des animaux capturés par les pêcheurs allemands étaient émaciés (Siebert *et al.*, 2001) et 71 % présentaient des lésions de broncho-pneumonie d'origine parasitaire plus ou moins étendues et sévères (Siebert *et al.*, 1996), les mêmes taux étant observés pour les marsouins capturés autour des îles britanniques (Kuiken, 1996b). Ces dernières données suggèrent que les marsouins capturés, censés représenter des animaux de référence, révèlent une incidence élevée d'émaciation et de broncho-pneumonie. L'origine d'une telle incidence au niveau de la population n'est pas déterminée, mais est peut être le reflet d'un biais, les animaux les plus faibles pouvant être plus facilement capturés. Comme nos données le suggèrent, le taux de capture n'est pas toujours similaire au taux de mortalité due à la capture. Dans notre étude, huit individus étaient considérés capturés, mais seuls sept étaient morts suite à cette capture. Dès lors, il convient de distinguer les animaux dont la mort est directement attribuable à la capture de ceux qui sont morts au préalable d'une autre cause.

La plupart des marsouins ne présentaient pas de lésion cutanée péri-mortem dues à l'abrasion sur le sable et étaient dans des états très variables de fraîcheur, laissant penser qu'en général les animaux meurent en mer et sont dressés sur la plage après la mort.

L'impact direct des activités humaines n'est exprimé dans notre étude qu'au travers de l'incidence des activités halieutiques. Dans ce cas, la capture dans les filets a été considérée comme étant responsable de la mort de 18 % des marsouins. Bien que des taux élevés de certains contaminants aient été rapportés parmi les marsouins émaciés de notre analyse, il n'a pas pu être établi si c'est l'émaciation qui prédispose à une augmentation des concentrations ou si, à l'inverse, les teneurs élevées en contaminants favorisent l'émaciation (Das *et al.*, 2001b).

4.2. Pinnipèdes

4.2.1. Lésions et observations post mortem

Les principales lésions des pinnipèdes dans la baie sud de la Mer du Nord ont été évaluées au travers des animaux échoués, plus particulièrement le phoque commun, sur le littoral belge et du nord de la France entre 1990 et 2000 (Etudes 2 et 3).

L'émaciation, les broncho-pneumonies, les lésions traumatiques et les entérites sont les principales observations nécropsiques. Les examens complémentaires révèlent de nombreux cas de septicémie et d'infection par un morbillivirus. Deux groupes de phoques apparaissent en fonction des observations *post mortem* (Tableau 8). D'une part, ceux qui présentent des évidences d'un processus morbide aigu et d'autre part, ceux qui présentent des évidences d'un processus morbide chronique. De manière générale, dans la première catégorie, les animaux sont dans un bon état d'embonpoint et présentent des évidences de traumatismes. A l'inverse, dans la seconde catégorie, les animaux sont émaciés et présentent des évidences de processus infectieux pouvant être secondaires à une infection par un morbillivirus.

	Processus aigu	Processus chronique
Lésions	Congestion et oedème pulmonaires, hématomes et hémorragies multiples, fractures	Emaciation, broncho-pneumonie, entérite, septicémie, encéphalite
Embonpoint	Suffisant graisse dorsale : 23,2 mm ± 6,8*	Insuffisant graisse dorsale : 3,9 mm ± 4,8*
Contenu alimentaire	Présent	Absent

Tableau 8 : Comparaison des principales observations *post mortem* entre les deux catégories de phoques considérés. * Phoques communs

4.2.1.1. Emaciation

L'émaciation est une observation fréquente chez les phoques échoués tant sur le littoral belge que sur les côtes anglaises (Baker, 1989; Barnett *et al.*, 2000). De plus, elle est le plus souvent présente chez les individus jeunes, après la fin de l'allaitement (Gerber *et al.*, 1993; Baker *et al.*, 1998). Une raison de cette perte de poids peut être la conséquence d'une séparation précoce d'avec la mère (Barnett *et al.*, 2000). Dans notre étude, l'émaciation apparaît aussi être concomitante aux processus infectieux. En effet, elle était plus fréquemment observée chez les phoques présentant de tels processus. L'émaciation est une observation souvent rapportée chez plusieurs espèces infectées par les morbillivirus, comme les chiens (Dungworth, 1993), les cétacés (Duignan *et al.*, 1992; Kennedy *et al.*, 1992a) ou les phoques (Munro *et al.*, 1992; Forsyth *et al.*, 1998), suggérant une évolution longue de la maladie (Baker, 1992a).

4.2.1.2. Processus morbide aigu

Sur 24 phoques autopsiés, 12 présentaient un processus morbide aigu, la plupart étant d'origine traumatique.

Seuls deux phoques ont été ramenés par des pêcheurs après une capture accidentelle. Dans cinq autres cas, le diagnostic a été établi par les observations *post mortem*, en utilisant les mêmes paramètres que pour les marsouins. Un phoque échoué, avec des empreintes cutanées de filet, présentait un hémithorax sévère probablement consécutif à la capture. Selon Baker et collaborateurs (1998), la capture dans les filets est responsable de la mort de 30 % des phoques gris juvéniles, mais ne semble pas représenter une menace pour cette espèce, ni pour les phoques communs (Northridge, 1985; 1992).

Les deux cas de perforation gastrique sont une autre conséquence des activités halieutiques, ces perforations étant provoquées par les baguettes métalliques utilisées sur les lignes de pêche. Des cas similaires ont été rapportés suite à l'ingestion d'autres corps étrangers comme des hameçons (Gulland *et al.*, 2001).

Finalement, des quatre phoques présentant des évidences de trauma telles que fractures de côtes et hémithorax, un a été écrasé sur une plage par une moto et un a été considéré capturé dans un filet. Les traumas avec des hémorragies internes étendues et des fractures de côtes ou du crâne sont fréquemment observés chez les jeunes phoques gris sans que pour autant une origine puisse être clairement définie (Baker *et al.*, 1998). Comme un individu fût retrouvé dans le port d'Oostende, une collision avec un bateau pourrait être à l'origine des lésions. Des conclusions similaires ont été retenues pour certains traumas observés chez les phoques échoués le long des îles britanniques (Baker, 1989).

4.2.1.3. Processus morbide chronique

Dans 50 % des cas, les phoques que nous avons autopsié présentaient des évidences de lésions infectieuses. Une proportion similaire est rapportée pour les phoques gris échoués sur les côtes de Grande-Bretagne (Baker, 1989). Comme pour notre analyse, il s'agissait essentiellement de lésions de broncho-pneumonie et d'entérite aiguë (Baker, 1989; 1998; Gerber *et al.*, 1993). Les investigations complémentaires ont permis, parmi ces individus, de diagnostiquer une infection par un morbillivirus. Les évidences de cette morbillivirose étaient basées sur les faits suivants :

- Forte immunofluorescence par l'utilisation d'un anticorps polyclonal anti-CDV dans le tissu pulmonaire et splénique (n = 2) ;
- Réaction immunohistochimique positive dans des tissus lymphoïdes avec un anticorps monoclonal dirigé contre l'hémagglutinine du PDV (n = 5) et avec un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine de fusion du CDV (n = 1) ;
- Particules virales, de type paramyxovirus, détectées en culture de cellules Vero après inoculation de tissus suspects (n = 2) ;

- Anticorps neutralisants contre le CDV (n = 6 ; titres de 1/8 à 1/126) ;
- Amplification de fragments spécifiques de 78 pb (n = 12) au départ de tissus congelés ainsi que de tissus fixés au formol et enrobés à la paraffine.

De plus, les signes cliniques, les lésions macroscopiques et microscopiques étaient similaires à ceux précédemment rapportés chez les autres espèces infectées (Kennedy *et al.*, 1989; Krogsrud *et al.*, 1990; Nunoya *et al.*, 1990; Daoust *et al.*, 1993; Duignan *et al.*, 1993; Bergman *et al.*, 1990).

Depuis 1998, 12 phoques ont été considérés comme étant infectés par un morbillivirus, que ce soit par un examen immunohistochimique et/ou par RT-PCR. Parmi ceux-ci, sept se sont échoués en août 1998 dont quatre étaient simultanément positifs par les deux tests. Durant ce mois, 11 phoques sont morts alors que pour la période 1990-1997, sur la même zone, seuls six phoques avaient été trouvés morts. Il apparaît clairement que la mortalité de l'été 1998 est à mettre en relation avec la morbillivirose. Il semble qu'ils soient les premiers cas rapportés en Mer du Nord depuis l'épizootie de 1988. A cette époque, la maladie avait été responsable de la mort d'environ 18.000 phoques sur une population estimée à 25.000 (Osterhaus et Vedder, 1988; Dietz *et al.*, 1989b). Après août 1998, cinq phoques ont présenté des évidences d'infection par un morbillivirus, dont deux simultanément positifs aux 2 méthodes de diagnostic utilisées, suggérant que des cas sporadiques de la maladie persistent en baie sud de la Mer du Nord.

Dans notre étude, le mauvais état de conservation de plusieurs individus n'a pas permis l'interprétation des images histologiques et immunohistochimiques. Dans ce cas, seule la RT-PCR, par l'amplification de petits fragments d'ARN, pouvait fournir un diagnostic (Krafft *et al.*, 1995). En effet, le protocole mis au point par Krafft et collaborateurs (1995), amplifiant des fragments de 78 pb, a été élaboré comme test pour effectuer un diagnostic au départ de tissus contenant de l'ARN dégradé suite soit à la fixation au formol et à l'enrobage à la paraffine soit au mauvais état de conservation de la carcasse. Dans de telles conditions, les amorces doivent être conçues pour amplifier une matrice ne dépassant pas environ 150 nucléotides (Krafft *et al.*, 1995). Il est important de souligner que la plupart des échantillons collectés sur les mammifères marins entrent dans ces conditions, les autopsies ne se déroulant en général que plusieurs heures, voire plusieurs jours après la mort. L'amplification de ce fragment de 78 pb a également été réalisée par un autre laboratoire confirmant ainsi le diagnostic (J. Stanton, communication personnelle). De plus, un fragment de 149 pb a pu être obtenu dans un cas et a été séquencé révélant une modification de trois pb par rapport à la séquence correspondante pour le PDV (J. Stanton, communication personnelle).

Les titres d'anticorps, obtenus après la mort, contre le CDV étaient très variables parmi les animaux présentant des évidences d'infection. Les raisons pouvaient être l'intervalle entre l'infection de l'animal et la mort. En effet, lors d'inoculation expérimentale, les animaux mouraient en général entre 11 et 16 jours après l'inoculation (Harder *et al.*, 1992) alors que les anticorps neutralisants apparaissaient à partir du 7^e jour pour atteindre des taux maxima chez les survivants après trois ou quatre semaines (Titenko *et al.*, 1991). Le faible taux d'anticorps pouvait aussi refléter de l'immunosuppression (Munro *et al.*, 1992). Finalement, il peut s'agir d'un effet d'âge, suite au caractère immature du système immunitaire des plus jeunes individus (Thompson *et al.*, 1992).

La pneumonie interstitielle est une observation fréquente chez les phoques infectés par le morbillivirus (Kennedy *et al.*, 1989; Duignan *et al.*, 1993). Aucun syncytia pulmonaire avec des corps d'inclusion n'a été observé dans nos échantillons, mais ces cellules multinuclées ne sont systématiquement présentes dans les lésions (Krogsrud *et al.*, 1990; Heje *et al.*, 1991; Kennedy *et al.*, 2000). En effet, elles sont plus fréquentes dans les tissus de cétacés que dans les tissus de pinnipèdes (Domingo *et al.*, 1992; Kennedy, 1998). Les cellules multinuclées observées dans les ganglions sont des cellules géantes d'origine parasitaire plutôt que des syncytia dus à l'infection virale. La déplétion lymphoïde conforte l'hypothèse que les infections à morbillivirus sont responsables chez les pinnipèdes d'une immunodépression, responsable d'infections secondaires telles que des septicémies, des broncho-pneumonies et des méningo-encéphalites aiguës purulentes.

La plupart des individus infectés étaient des juvéniles d'environ huit semaines. Cet âge correspond à la perte de l'immunité passive anti-PDV d'origine maternelle, responsable d'une plus grande susceptibilité à l'infection par le PDV (Harder *et al.*, 1993). Visser et collaborateurs (1993) rapportent le cas de six jeunes phoques morts de morbillivirose deux semaines après la naissance alors que les parents ne montrèrent aucun signe de la maladie, constat similaire à nos observations. Finalement, comme souligné précédemment, cette susceptibilité d'âge peut également refléter le caractère immature du système immunitaire, les taux d'anticorps anti-CDV étant inférieurs chez les juvéniles par rapport aux adultes (Thompson *et al.*, 1992).

Au début des années nonante, la plupart des phoques en Mer de Wadden, le long des côtes hollandaises, avaient des anticorps spécifiques anti-morbillivirus suggérant que l'infection y avait persisté après l'épizootie de 1988 (Visser *et al.*, 1993c). En effet, des individus juvéniles (de trois mois à un an) ayant perdu leur immunité passive maternelle étaient séropositifs en 1992. Il est donc plus que probable que l'infection par le morbillivirus ait persisté dans de petits groupes de phoques sans maladie clinique (Visser *et al.*, 1993c). Une autre raison expliquant la réapparition de la maladie le long de nos côtes en 1998 pourrait être liée à la présence de vecteurs en baie sud de la Mer du Nord. Ainsi, l'épizootie soudaine de 1988 semble être

associée à la présence inhabituelle de phoques du Groenland infectés provenant de la Mer de Barents (Goodhart, 1988; McGoutry, 1988; Heide-Jorgensen *et al.*, 1992). Une modification de leur aire de répartition pourrait avoir permis l'infection d'une population naïve (Kennedy, 1998). En effet, les phoques communs de la Mer du Nord n'avaient pas été exposés avant 1988, et devinrent séropositifs par la suite (Thompson *et al.*, 1992) tandis que les phoques annelés et du Groenland étaient séropositifs dès 1985. Malheureusement, le statut immunologique des phoques du Groenland présents en Mer du Nord en 1987 est inconnu. Néanmoins, des phoques à capuchon en Mer de Barents, étaient séropositifs pour le CDV et le PDV en 1991 et 1992 sans aucune évidence d'infection clinique (Stuen *et al.*, 1994). Les observations de phoques à capuchon en baie sud de la Mer du Nord depuis la fin des années nonante, loin au sud de leur zone de répartition normale, pourraient étayer l'hypothèse de la réintroduction d'une espèce vecteur.

4.2.2. Analyses toxicologiques

Les investigations toxicologiques préliminaires réalisées sur les phoques communs échoués le long des côtes belge et du nord de la France révèlent des taux très bas de cadmium et de mercure, ces concentrations basses étant vraisemblablement à mettre en rapport avec le jeune âge de la plupart des individus (Das *et al.*, 2000).

4.2.3. Causes de la mort et impact des activités humaines

Les deux catégories de lésions, infectieuses et traumatiques, permettent d'identifier deux catégories de causes de mortalité :

Dans les cas de processus aigu, la mort est liée à une capture dans un filet ou à un trauma responsables d'hémorragies cavitaires ou tissulaires étendues provoquant une hypotension sévère ou un *shock* hypovolémique.

Dans les cas de processus chronique (figure 5), la mort est liée aux lésions infectieuses (septicémie, broncho-pneumonie, encéphalite) souvent secondaire à une morbillivirose. De plus, la broncho-pneumonie peut aussi être secondaire à la parasitose respiratoire.

Considérant les 24 phoques pour lesquels une autopsie complète a pu être réalisée, les activités humaines sont responsables de la mort dans 46 % des cas. Cette incidence élevée est vraisemblablement consécutive aux importantes activités halieutiques et de loisirs de notre littoral ainsi que du comportement côtier des phoques.

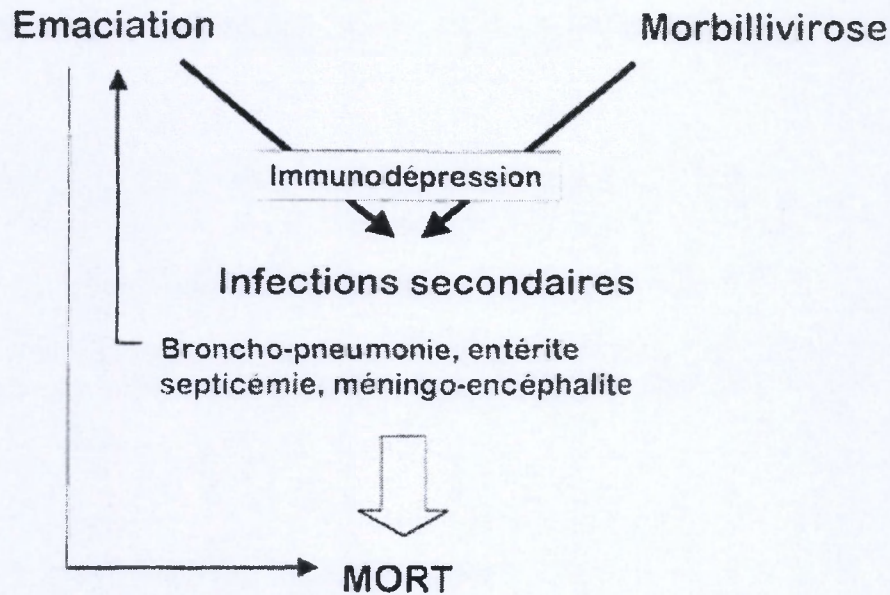


Figure 5 : Processus morbide chronique observé chez les phoques lors d'infection par un morbillivirus.

Un impact indirect des activités humaines, la pollution marine, et plus particulièrement les PCBs, a souvent été évoquée pour expliquer la susceptibilité des phoques communs à la morbillivirose (Hall *et al.*, 1992; Mitchell et Kennedy, 1992; Simmonds, 1992). Néanmoins, cette prédisposition reste sujette à controverse, certains considérant que les PCBs n'interviennent pas dans les épizooties à morbillivirus, tandis que d'autres suggèrent qu'ils puissent intervenir dans la sévérité de l'épidémie (Busbee *et al.*, 1999; O'Shea, 2000; Ross *et al.*, 2000). En effet, les PCBs sont responsables de déplétion du système immunitaire des mammifères marins (Ross *et al.*, 1995; 1996; de Swart *et al.*, 1995b; 1994) et des taux élevés de PCBs ayant été rapportés chez les animaux infectés (Aguilar et Borrell, 1994; Kuehl et Haebler, 1995; Guitart *et al.*, 1996). Il a été suggéré que ces contaminants, suite au processus de bioamplification de la chaîne alimentaire, puissent induire une sensibilité particulière vis-à-vis de l'infection virale. Cependant, comme le signale Kennedy (1999), des épidémies sévères de rougeole ou de peste bovine sont décrites depuis des siècles, bien avant l'apparition de ces toxiques environnementaux. De plus, la distinction est malaisée entre une immunosuppression associée à la morbillivirose et un effet immunotoxique des contaminants.

Plusieurs possibilités permettent d'expliquer la répartition temporelle hétérogène des échouages entre 1990 et 2000. Il peut s'agir d'une part, d'une augmentation de la mortalité consécutive à l'émergence de morbillivirose ou à une pression plus importante des activités halieutiques; ou d'autre part, d'un accroissement de la population locale de phoques. En effet, dans ce dernier cas de figure, les taux de mortalité restant les mêmes, on peut assister à une augmentation des échouages. Indépendamment de ces deux considérations, l'extension

géographique du réseau MARIN, ainsi qu'une meilleure coordination des échouages a permis d'acquérir un plus grand nombre d'individus.

4.3. Grands cétacés

Les plupart des données publiées sur les lésions des grands cétacés proviennent des animaux capturés lors des activités de pêche baleinière (Cockrill, 1960b; 1960a; Uys et Best, 1966; Lambertsen, 1986; Lambertsen et Kohn, 1987; Lambertsen, 1997), et la littérature est virtuellement absente quant aux lésions et aux causes de mortalité des grands cétacés, plus particulièrement lors d'échouage massif (deux ou plus de deux individus). Parmi les principales raisons de cette absence de données, citons les difficultés techniques liées à l'exécution sur la plage de l'autopsie rapide de carcasses de plusieurs dizaines de tonnes (entre 22 et 38 tonnes pour les cachalots échoués à Coxyde en novembre 1994) (Jauniaux *et al.*, 1999).

4.3.1. *Echouage massif*

Un échouage massif se définit comme un échouage simultané d'au minimum deux individus (à l'exclusion d'une mère et de son jeune) au même endroit (Geraci et Lounsbury, 1993). Ce type d'échouage est décrits depuis très longtemps, certains étant déjà rapportés au XVIe siècle en Mer du Nord (Smeenk, 1997). En effet, de 1577 à 1989, 42 échouages massifs de cachalots ont été répertoriés dans le monde dont un quart en Mer du Nord (Rice, 1989). Depuis, neuf autres accidents ont été répertoriés rien que sur cette zone (Smeenk, 1997; 1999). De très nombreuses théories ont été construites pour expliquer ces phénomènes (Geraci et Lounsbury, 1993), certaines allant jusqu'à évoquer des comportements de fuite du milieu marin ou des suicides collectifs. Récemment, par l'établissement d'autopsies et des collectes d'échantillons systématiques, des théories plus scientifiques ont pu être avancées (Geraci *et al.*, 1999). Les éléments constants que à retenir lors de ces échouages sont qu'il s'agit le plus souvent d'espèces pélagiques, grégaires et ayant une forte cohésion sociale.

Pour la Mer du Nord, des investigations sur les causes de mortalité et d'échouage ont pu être réalisées à trois occasions grâce aux examens *post mortem* effectués sur quatre cachalots échoués à la côte belge et trois cachalots sur la côte hollandaise lors de l'hiver 1994-95 (Etude 4) ainsi que sur 5 cachalots échoués aux Pays-Bas en 1997 (Garcia-Hartmann, communication personnelle). Ces examens ont permis d'établir une théorie expliquant les échouages de cachalots dans la baie sud de la Mer du Nord.

Les lésions les plus importantes, similaires dans les trois échouages, sont d'une part des ulcérations de la peau et du palais ainsi que l'émaciation des individus ; d'autre part, les érosions cutanées et la congestion passive viscérale généralisée.

Les lésions ulcératives évoquent une étiologie virale (inclusions cytoplasmiques positives à la coloration de Feulgen, spongieuse et dégénérescence hydropique). Les mêmes observations ont été faites sur les cachalots échoués aux Pays-Bas en 1997 (Jauniaux, non publié). Néanmoins, aucune particule virale n'a pu être identifiée par microscopie électronique. Lors de morbillivirose chez les grands dauphins (Lipscomb *et al.*, 1994a) et chez les dauphins bleu-blanc (Domingo *et al.*, 1992), des stomatites ulcératives ont été observées. Selon Domingo (1992), ces ulcères seraient des infections secondaires à un calici- ou un herpèsvirus). De plus, tous les cachalots examinés présentaient des otites externes ulcératives subaiguës à chroniques. De telles lésions n'ont apparemment jamais été décrites jusqu'ici chez des cétacés. Parmi les mammifères domestiques, ces lésions, le plus souvent d'origine infectieuse, peuvent s'étendre vers l'oreille moyenne et interne, et via le nerf VIII, provoquant de la méningite ainsi que de l'encéphalite (Wilcock, 1993). Néanmoins, en raison de contraintes techniques, une possible extension en profondeur n'a pas pu être investiguée. En plus des lésions ulcératives, les cachalots présentaient une réduction de l'épaisseur du lard dorsal, une absence de graisse abdominale et une perte de poids, suggérant un processus chronique de débilitation, plus marqué sur les animaux échoués aux Pays-Bas. Une des origines possibles de cet état est l'absence de nourriture adéquate pour les cachalots dans cette région. En effet, lors des autopsies, le tube digestif était vide, à l'exception de quelques becs de céphalopodes vivants de l'Atlantique nord (Lick *et al.*, 1996). Ces lésions étaient présentes avant l'échouage et peuvent avoir prédisposé à l'échouage des cachalots.

Le second groupe de lésions rassemble les abrasions hémorragiques cutanées dues aux frottements sur le sable lors de l'échouage ainsi que la congestion viscérale généralisée. Elles sont fréquemment présentes sur les animaux échoués (Geraci et Lounsbury, 1993; Needham, 1993). Ces lésions étant *peri mortem*, elles laissent à penser que les animaux s'échouent vivants. Ainsi, bien que découverts morts, les cachalots de Coxyde sont arrivés vivants sur la plage. La congestion passive viscérale et les hématomes disséminés sur la séreuse intestinale suggèrent qu'une altération vasculaire aiguë est la cause de la mort, vraisemblablement suite à un *shock* consécutif à une défaillance cardio-vasculaire (Cotran *et al.*, 1994b). Ce schéma est une des conséquences les plus fréquentes lors d'un échouage de mammifères marins (Geraci et Lounsbury, 1993; Needham, 1993). Ainsi, ce groupe de lésions résulte directement de l'échouage et permet d'identifier la cause de la mort.

4.3.2. Hypothèse d'échouage des cachalots

En fonction de ces différentes observations et des connaissances fragmentaires sur le comportement des cachalots ainsi que des conditions océanographiques particulières des zones d'échouages, une hypothèse (Figure 6) permet expliquer les échouages massifs des cachalots dans la baie sud de la Mer du Nord.

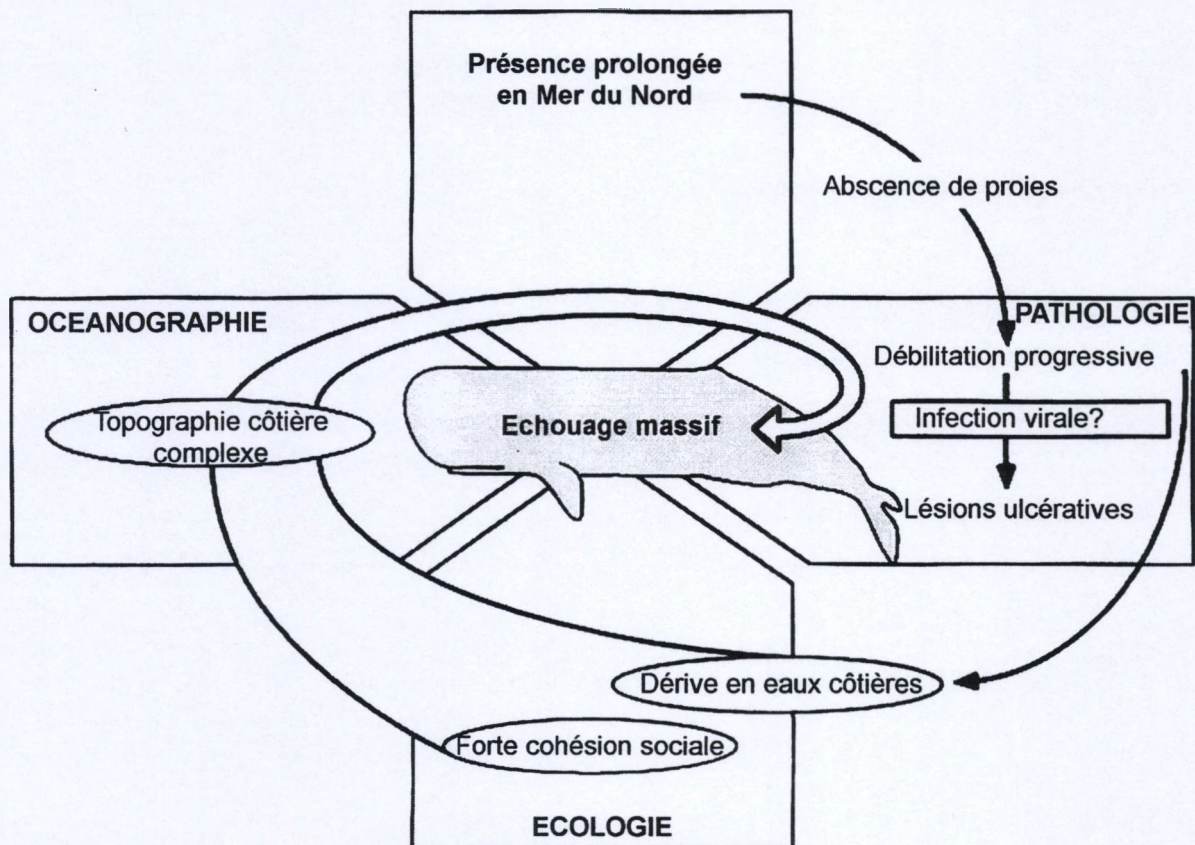


Figure 6 : Représentation schématique de l'hypothèse pour les échouages massifs de cachalots en Mer du Nord.

En Atlantique nord-est, les cachalots mâles sexuellement matures sont présents tout l'été, au large de la Norvège et de l'Islande. Ils effectuent des migrations vers le sud en automne, en suivant vraisemblablement la marge du plateau continental à l'ouest des îles britanniques. Lors de ce trajet, certains individus pénétreraient en Mer du Nord, pour des raisons qui restent non définies. A l'est de la jonction entre l'Atlantique et la Mer du Nord, il existe une faille océanique, le canal norvégien, de plus de 200 mètres de profondeur et qui longe la Norvège, se terminant au niveau du Danemark (Skagerrak). Il est probable que c'est par cette faille qu'ils

s'engagent. La profondeur se réduit alors rapidement pour atteindre moins de 40 mètres dans la partie méridionale. De plus, la baie sud a la forme d'un entonnoir avec une topographie côtière complexe avec des hauts fonds et de nombreux bancs de sables à proximité des plages. Les cachalots séjournent plusieurs semaines dans ces zones inhospitalières sans pouvoir s'alimenter adéquatement. Ils s'amaigrissent progressivement et deviennent débilités favorisant d'autant le risque d'infection secondaire. En effet, deux mois séparent les échouages de Coxyde et de Scheveningen et les cachalots échoués à Scheveningen présentaient des évidences de débilitations plus avancées. Il est vraisemblable que ces animaux se trouvent finalement bloqués dans des bancs de sable à marée descendante. La cohésion sociale entre les individus explique l'échouage massif. Ainsi, la baie sud de la Mer du Nord peut-être considérée comme un piège pour les animaux affaiblis par leurs séjours prolongés dans ces eaux et ils ont peu de chance de s'échapper de ce "cul-de-sac". Pour confirmer cette théorie de l'effet de "cul-de-sac", il faut souligner que les échouages massifs de cachalots se produisent toujours dans des zones à topographie complexe (Smeenk, 1997). Ainsi, quelques zones d'échouages existent dans le prolongement du canal de Norvège, situées dans les îles frisonnes danoises, allemandes et hollandaises ainsi qu'au niveau des Bancs des Flandres (Smeenk, 1997). D'autres échouages sont situés ailleurs mais dans une fréquence moindre. Lorsque les cachalots sont engagés en Mer du Nord, la probabilité d'échapper au piège est vraisemblablement très faible car ils doivent continuer vers le sud et se retrouveront tôt ou tard dans un inextricable labyrinthe de bancs de sable. Néanmoins, 5 cachalots ont été observés échoués sur un banc de sable en Zélande hollandaise, le 5 décembre 2000, sans être complètement émergés à la marée basse (C. Smeenk, communication personnelle). Ils réussirent à se dégager et furent observés le lendemain plus au sud mais dans l'estuaire de la Tamise. Finalement, le 7 décembre, ils furent observés au large de Zeebrugge puis disparurent (J. Haelters, communication personnelle). Ainsi, on ne peut pas exclure que certains individus arrivent par "tâtonnement", comme un jeu de ping-pong entre les rives de la baie sud de la Mer du Nord, à sortir du piège.

La contribution de pathologistes vétérinaires dans l'application d'une telle hypothèse peut se résumer de la façon suivante :

- Les cachalots s'échouent vivants (érosions cutanées *peri mortem*) ;
- Les animaux sont débilités et ont séjourné longtemps en Mer du Nord sans s'alimenter adéquatement (émaciation, lésions ulcératives subaiguës des membranes cutano-muqueuses, absence de contenu alimentaire récent) ;
- La mort est la conséquence de l'échouage (*shock* cardio-vasculaire).

4.3.3. Morbillivirose

Une infection par un morbillivirus a pu être identifiée à deux reprises sur des rorquals communs échoués, l'un sur la côte belge (1997), l'autre sur la côte française (1998). Le diagnostic, principalement obtenu sur l'animal échoué à Raversijde, est basé sur la coloration spécifique à l'immunohistochimie, l'amplification de fragments de 78 pb spécifiques du gène de la phosphoprotéine P du morbillivirus et la présence de particules virales dans les lésions et en culture. L'examen du rorqual de Wiemereux a été limité par une collecte incomplète d'échantillons consécutive à l'absence de matériel technique et un mauvais état de conservation de la carcasse.

L'examen histologique a permis de mettre en évidence, au niveau de différents tissus mais principalement dans les ganglions lymphatiques, des cellules syncytiales présentant un marquage spécifique par immunohistochimie. Ces observations sont similaires à celles rapportées au niveau des ganglions lymphatiques de dauphins bleu-blanc (Domingo *et al.*, 1992; Duignan *et al.*, 1992) et de grands dauphins (Lipscomb *et al.*, 1994b; 1996) infectés par le DMV.

Il semble que ce soit le premier cas rapporté d'infection par un morbillivirus avec des lésions associées chez des baleines à fanons. Des anticorps neutralisants anti-PDV ont été précédemment rapportés chez des rorquals capturés en Islande (Blixenkronne-Møller *et al.*, 1996) et anti-CDV chez des petits rorquals en Méditerranée (Di Guardo *et al.*, 1995). Néanmoins, dans aucun cas, des évidences de lésions associées ne furent rapportées, le diagnostic étant réalisé uniquement par examen sérologique.

Comme signalé précédemment, le protocole de RT-PCR a été choisi pour amplifier de petits fragments d'ARN au départ de tissus contenant de l'ARN dégradé. Néanmoins, le résultat obtenu (utilisé comme tissu de référence dans l'étude 3) a permis de confirmer le diagnostic comme cela a pu être réalisé pour des dauphins échoués sur les côtes des Etats-Unis (Krafft *et al.*, 1995).

La déplétion lymphoïde et la présence importante d'antigènes de morbillivirus dans les ganglions lymphatiques suggèrent, comme pour les autres espèces (Cheville, 1994; Kennedy *et al.*, 1991; Lipscomb *et al.*, 1994b), que la maladie peut être responsable d'immunosuppression responsable infections secondaires. Dans le cas du rorqual de Raversijde, la salmonellose intestinale pourrait en être la conséquence.

Depuis lors, deux autres rorquals ont été autopsiés, l'un échoué le 21 novembre 1999 à Dunkerque (France), l'autre retrouvé mort le 13 janvier 2001 dans les installations portuaires de

Vlissingen (Pays-Bas). Aucune évidence d'infection par un morbillivirus n'a pu être mise en évidence (Jauniaux T., données non publiées).

En raison du mode de vie des rorquals communs, disséminés dans les océans en groupes de 4 à 20 individus (Evans, 1992), une maladie infectieuse ne se transmettra que lentement. Néanmoins, dans les zones d'alimentation, les groupes peuvent atteindre une centaine d'animaux (Gambell, 1985), facilitant la dissémination de l'infection comme pour les autres espèces de cétacés (Duignan *et al.*, 1995a). Il est dès lors légitime de considérer le morbillivirus comme un risque pour cette espèce.

Par contre, chez les cachalots échoués, en Belgique (1994) ou aux Pays-Bas (1995, 1997), la recherche d'antigène du PDV s'est révélée négative.

4.3.4. Analyses toxicologiques

Les examens toxicologiques effectués sur les tissus des cachalots échoués sur la côte belge en novembre 1994 ont montré de basses concentrations pour la plupart des contaminants inorganiques, à l'exception du cadmium et du mercure (Bouquegneau *et al.*, 1997; Joiris *et al.*, 1997). Néanmoins, ce dernier était détoxifié sous la forme de tiemmanite (Joiris *et al.*, 1997). Les concentrations en cadmium sont classiquement élevées chez les espèces teuthophages (les céphalopodes dont ils se nourrissent sont riches en cadmium) mais elles étaient deux fois supérieures à celles décrites dans la littérature (Bouquegneau *et al.*, 1997). De plus le cadmium n'était pas détoxifié par liaison aux métallothionéines et selon Bouquegneau et collaborateurs (1997), il aurait pu participer au processus de débilitation des cachalots. Finalement, les concentrations en PCBs sont de l'ordre de grandeur de celles précédemment rapportées pour cette espèce (Joiris *et al.*, 1997).

Les études préliminaires réalisées sur les rorquals indiquent une faible contamination par le cadmium et le mercure (Das *et al.*, 2000).

4.3.5. Causes de la mort et impact des activités humaines

Comme signalé précédemment, la mort des cachalots résulte de l'échouage, lui-même consécutif à un séjour prolongé dans un lieu inhospitalier, responsable d'une débilitation progressive. Le rôle de la morbillivirose dans les mortalités de rorquals communs reste à élucider mais a predisposé à la mort de deux individus sur quatre autopsiés

Un seul cas de mortalité de grands cétacés peut être attribué, de manière directe, aux activités humaines. Il s'agit du rorqual mort dans le port de Vlissingen. En effet, il s'est

retrouvé littéralement coincé dans les infrastructures de soutien d'un des docks et est mort noyé à la marée haute (M.Garcia Hartmann, communication personnelle).

Le rorqual de Dunkerque présentait quant à lui des lacérations profondes et étendues laissant suspecter des impacts d'hélice. Néanmoins, aucune hémorragie n'était associée à ces lacérations suggérant que ces coups sont survenus après la mort de l'animal.

5. CONCLUSIONS

A ce jour, aucune étude à long terme n'avait été menée sur les lésions et les causes de mortalité des mammifères marins échoués sur les côtes continentales de la baie sud de la Mer du Nord. L'identification de lésions et la hiérarchisation selon leur importance et leur chronologie respectives ont permis de générer des hypothèses permettant de mieux comprendre les processus responsables de l'échouage des petits ou des grands cétacés ainsi que des pinnipèdes. De plus, l'impact des activités humaines, sur ces espèces vivant dans un milieu à fortes pressions anthropiques a pu être mieux cerné.

De manière plus spécifique, au travers des différentes études, les conclusions suivantes apparaissent :

Pour les petits cétacés :

Environ 50 % des marsouins présentaient simultanément de l'émaciation, de la broncho-pneumonie aiguë et des infestations parasitaires multiples sévères, cette trilogie compliquant l'identification de la cause de la mort. Le modèle pathogénique pour expliquer la plupart des mortalités découle du schéma suivant : l'émaciation et le parasitisme multiple sévère prédisposent l'animal à des broncho-pneumonies bactériennes qui seront responsable de la mort.

L'émaciation et la broncho-pneumonie d'origine parasitaire sont également présentes parmi les animaux capturés dans les filets, révélant une incidence élevée de ces lésions dans la population de marsouins.

L'impact majeur des activités humaines se traduit essentiellement par les captures dans les filets de pêche (18 % des mortalités enregistrées) avec des fréquences inférieures à celles observées dans la plupart des autres pays limitrophes de la Mer du Nord. Néanmoins, en l'absence de critères pathognomoniques lors de l'autopsie, il est difficile de diagnostiquer un mort suite à une capture accidentelle sur un animal échoué. Ce diagnostic est posé le plus souvent par exclusion des autres causes de mortalité. Ainsi, le pourcentage de capture est plus que vraisemblablement sous-estimé. Les données relatives aux contaminations par les métaux

lourds suggèrent une relation entre l'émaciation et les concentrations rénale et hépatique en zinc. Il n'est pas encore établi si l'émaciation prédispose aux modifications de concentrations de zinc ou à l'inverse, si les teneurs élevées de zinc favorisent l'émaciation.

Bien que persistante dans d'autres régions de la Mer du Nord, aucune évidence d'infection par un morbillivirus n'a pu être établie, et ce bien que des analyses sérologiques et immunohistochimiques aient été effectuées.

Pour les pinnipèdes

En fonction des lésions, les individus peuvent être distribués en deux catégories avec une répartition égale entre celles-ci. D'une part, des phoques présentaient des évidences d'un processus morbide aigu, d'autre part, des phoques présentant un processus morbide chronique.

La première moitié incluait des phoques présentant des évidences de capture dans les filets et de processus traumatiques. La seconde moitié présentait de l'émaciation et des processus infectieux divers (broncho-pneumonie, entérite, septicémie), la plupart étant secondaires à une infection par un morbillivirus.

La morbillivirose, responsable d'une mortalité majeure de phoques communs en Mer du Nord à la fin des années quatre-vingt, avait disparu depuis 1990. Les cas décrits dans notre étude sont les premiers depuis lors. Il s'agissait chaque fois de phoques au moment du sevrage dont la plupart se sont échoués durant le mois d'août 1998. Par la suite, deux autres individus furent considérés morts suite à l'infection, suggérant la persistance de cas sporadiques. Comme décrit précédemment, ces infections étaient responsables d'immunodépression favorisant des infections secondaires mortelles. Les analyses préliminaires indiquent que le morbillivirus responsable de la mortalité de 1998 est fort similaire au PDV responsable de l'épizootie de 1988.

L'impact des activités humaines sur la population de phoques a pu être évalué par l'incidence des captures dans les filets et des traumatismes, observée chez 12 phoques. Dans neuf cas, il s'agissait d'interaction directe avec les activités halieutiques. Les activités de loisir ont été responsables de la mort d'au moins un individu, écrasé sur la plage. Aucune origine n'a pu être clairement identifiée pour les deux derniers phoques. Ainsi, on peut conclure que la cause de la mort de près de la moitié des phoques étudiés est en relation directe avec les activités humaines.

Pour les grands cétacés

Notre étude a pu montrer que la plupart des cachalots, bien que certains soient découverts morts, s'échouaient vivants ; qu'ils étaient débilités et avaient séjourné longtemps en Mer du Nord sans s'alimenter (émaciation, lésions ulcératives subaiguës des membranes cutanomuqueuses, absence de contenu alimentaire récent) ; et, finalement, que la mort était la

conséquence de l'échouage. Ces informations ont permis de construire une hypothèse spécifique expliquant les échouages massifs de cachalots dans la baie sud de la Mer du Nord.

Chez les rorquals communs, les analyses ont permis d'identifier une infection par un morbillivirus chez deux individus sur les quatre individus autopsiés entre 1990 et 2000. Il s'agissait de la première description de lésions associées à cette infection dans cette espèce ainsi que chez les baleines à fanons. Dans les deux cas, les animaux étaient émaciés et présentaient des évidences d'immunodépression. L'incidence de cette maladie au niveau de la population est vraisemblablement faible. Néanmoins, elle présente une menace potentielle complémentaire pour cette espèce.

6. PERSPECTIVES

Différentes perspectives peuvent être envisagées à l'issue de ce travail, que se soit pour le groupe MARIN ou les recherches scientifiques associées.

Groupe MARIN

Depuis 1995, des efforts d'extension dans les zones adjacentes ont été réalisés, principalement vers le sud, et ont abouti à une couverture des côtes de l'estuaire de l'Escaut à la baie de la Somme et récemment jusqu'au Havre. L'approche multidisciplinaire du groupe MARIN dépasse ainsi largement les limites géographiques territoriales. Ce groupe devrait s'intégrer à l'échelle de la Mer du Nord en s'associant aux autres réseaux européens d'étude des mammifères marins et à certains projets européens tels que BIO CET⁸. Une des limites majeures de ce programme est que les animaux analysés sont en grande partie des animaux échoués, les animaux capturés dans les filets étant rarement rapportés par les pêcheurs. Néanmoins, ces individus sains pourraient représenter des animaux de référence, servant de témoins, que ce soit pour les investigations pathologiques ou toxicologiques. Pour des raisons techniques et éthiques, l'expérimentation animale de type toxico-pathologie sur les mammifères marins en général, et les cétacés en particulier, n'est pas réalisable. Ainsi, la sensibilisation des pêcheurs, grâce à un émoulement quelconque, devrait nous permettre dans le futur d'avoir plus fréquemment accès aux individus capturés et ainsi obtenir une meilleure interprétation des relations entre les données pathologiques et toxicologiques.

Recherches associées

Dans deux espèces, des infections à morbillivirus ont été diagnostiquées. Des travaux préliminaires ont été réalisés pour tenter de caractériser ces virus. Dans le cas des phoques

⁸ *Bioaccumulation of Persistent Organic Pollutants in Small Cetaceans in European Waters: Transport Pathways and Impact on Reproduction*

infectés en 1998, les résultats semblent indiquer des variations mineures au sein du gène de la phosphoprotéine P du PDV. Une caractérisation plus complète devrait nous indiquer si le virus ayant infecté ces individus est différent de celui de l'épizootie de 1988. Pour le morbillivirus du rorqual, un travail similaire de caractérisation devrait permettre de savoir à quel morbillivirus de mammifères marins il s'apparente le plus ou s'il s'agit d'un virus différent. En effet, si la classification des morbillivirus est bien établie entre ceux des odontocètes et des pinnipèdes, la place du virus de ce mysticète reste encore à définir. Ainsi, au sein de ces deux espèces, une description plus complète de certaines séquences génomiques du virus par RT-PCR devrait nous permettre de compléter la classification des morbillivirus.

Bien que les lésions et causes de mortalité, ainsi que les concentrations en contaminant soient bien établies parmi les populations de mammifères marins échoués en baie sud de la Mer du Nord, les relations entre les données pathologiques et toxicologiques ne sont pas encore bien définies. Plusieurs pistes sont à suivre ou à développer comme l'identification d'indicateurs tissulaires des altérations associées à l'exposition aux contaminants décrits en situation expérimentale (induction du cytochrome P450, la présence d'adduits de l'ADN,...). Un domaine tout particulièrement inconnu chez les mammifères marins est leur système immunitaire qui semble d'une part, souvent être mis en cause dans l'apparition et l'évolution de leurs maladies et d'autre part, être la « cible » privilégiée de nombreux toxiques. Ainsi, une meilleure distinction morphologique des cellules impliquées et des tests fonctionnels sur des lymphocytes isolés de mammifères marins sains devraient améliorer la connaissance des relations entre l'exposition à certains contaminants et la fonction immunitaire.

7. RESUME

Depuis 1990, le groupe MARIN (*Marine Animals Research & Intervention Network*) est en charge des recherches scientifiques multidisciplinaires réalisées sur les mammifères marins échoués sur les côtes belge et du nord de la France. Occasionnellement, ce groupe est associé aux autopsies effectuées sur les animaux échoués aux Pays-Bas.

Le but de l'étude était d'identifier les lésions et les causes de mortalité des petits et des grands cétacés ainsi que des pinnipèdes échoués sur les côtes continentales de la baie sud de la Mer du Nord. Etant donné qu'il s'agit d'une région à forte pression anthropique, les relations entre les lésions et les concentrations en contaminant ainsi que les activités humaines comme la navigation et la pêche commerciale ont été analysées. Pour chaque groupe considéré (petits et des grands cétacés, pinnipèdes), des théories ont été élaborées afin de définir les mécanismes morbides.

Petits cétacés :

Pour illustrer les lésions et les causes de mortalité des petits cétacés, le marsouin commun a été utilisé comme animal de référence (Etude 1). Entre 1990 et 2000, 55 marsouins ont été autopsiés. La distribution annuelle était très irrégulière avec un pic d'échouage en 1999. Les observations *post mortem* les plus fréquentes étaient l'émaciation (60 %), avec une réduction ou une absence de graisse ainsi qu'une amyotrophie sévère ; des broncho-pneumonies aiguës (49 %) ; et de la parasitose sévère multiple (51 %), caractérisée par des infestations parasitaires de plusieurs organes qui présentaient des lésions associées. La capture dans les filets de pêche a été responsable de 18 % de mortalité. Le plus souvent, le tractus digestif était vide, sans évidence de repas récent (83 %).

Aucun cas d'infection par un morbillivirus n'a été mis en évidence que ce soit par immunohistochimie ou par culture cellulaire. De plus, tous les animaux testés sérologiquement se sont révélés négatifs pour la brucellose.

Les broncho-pneumonies étaient souvent associées à la parasitose multiple et/ou à l'émaciation. Ces dernières sont des processus chroniques débilants qui prédisposent à une broncho-pneumonie fatale.

Pinnipèdes :

Pour illustrer les lésions et les causes de mortalité des pinnipèdes, le phoque commun a été utilisé comme animal de référence (Etude 2 et étude 3). Trente quatre phoques ont été autopsiés et les principales observations nécropsiques étaient l'émaciation, les broncho-pneumonies et les entérites aiguës. D'autres lésions suggéraient un processus traumatique comme des hématomes musculaires, des fractures multiples de côtes, des hémothorax et des cas de péritonites associées à des perforations gastriques par des corps étrangers. La plupart des phoques avaient un tube digestif vide, sans contenu alimentaire récent.

Douze phoques étaient infectés par un morbillivirus depuis 1998. Durant l'été de cette année, 16 phoques se sont échoués en moins d'un mois. L'infection a été diagnostiquée principalement par immunohistochimie et par RT-PCR. Par cette dernière technique, des fragments attendus de 78 pb du gène de la phosphoprotéine du PDV ont été obtenus de différents tissus congelés ou fixés au formol et enrobés à la paraffine.

Deux catégories de cause de mortalité peuvent être facilement identifiées sur les carcasses bien conservées : d'une part, celles en relation avec un processus morbide aigu, en général associé à des lésions non-infectieuses (capture dans les filets, trauma) et d'autre part, les mortalités en relation avec un processus chronique associé à des lésions infectieuses. Les maladies infectieuses étaient pour la plupart secondaires à une morbillivirose. Quelques cas de broncho-pneumonie étaient secondaires à de la verminose respiratoire. Les animaux présentant un processus infectieux étaient pour la plupart émaciés, révélant une maladie débilante longue. Les lésions traumatiques étaient dues à la capture dans les filets, à des collisions et à l'ingestion de corps étrangers. Ces individus présentaient un état d'embonpoint suffisant.

Les cas cliniques associés à l'infection par un morbillivirus semblent être les premiers de cette maladie en Mer du Nord depuis l'épizootie de 1988-1989 qui avait tué 18.000 phoques sur une population estimée à 25.000.

Grands cétacés

Quatre cachalots, échoués à la côte belge (1994) et trois autres, échoués sur une plage hollandaise ont été autopsiés. Il s'agissait de mâles sexuellement mûres. Les lésions significatives étaient des abrasions cutanées ventrales, des ulcères aigus de la peau, des

stomatites et des otites aiguës ulcéraives, et de la congestion viscérale généralisée. De plus, les individus étaient débilités (déficit pondéral sévère, réduction du lard dorsal et absence de graisse abdominale) et ne présentaient pas de contenu dans le tractus digestif.

L'examen histologique des lésions cutanées suggérait une étiologie virale, mais aucune particule virale n'a pu être mise en évidence par l'examen en microscopie électronique. De plus, l'examen immunohistochimique est resté négatif pour la mise en évidence d'un morbillivirus. L'émaciation et les lésions ulcéraives étaient présentes avant l'échouage tandis que les abrasions cutanées ventrales et la congestion viscérale généralisée étaient provoquées par l'accident.

L'absence de contenu alimentaire, la perte de poids et la réduction du lard dorsal sont compatibles avec une présence prolongée des cachalots en Mer du Nord où leurs proies ne sont pas disponibles. Les individus se sont progressivement affaiblis, favorisant des infections virales secondaires. Finalement, la topographie côtière complexe de la baie sud de la Mer du Nord a joué un rôle de piège, emprisonnant les animaux dans les bancs de sable.

Quatre rorquals communs, un échoué en Belgique (1997), deux autres en France (1998 et 1999) et un dernier, bloqué dans les infrastructures d'un port aux Pays-Bas (2001), ont été autopsiés (Etude 5). Il s'agissait de femelles d'environ un an. Dans deux cas, l'autopsie n'a pas pu être complètement réalisée en l'absence d'équipement lourd de levage ainsi que suite au mauvais état de conservation des carcasses. Les trois individus échoués étaient émaciés avec une épaisseur réduite de la couche de lard tandis que l'animal bloqué dans le port avait un état d'embonpoint suffisant.

L'examen histologique des ganglions lymphatiques mésentériques et de la glande mammaire de l'individu échoué en Belgique, a révélé la présence de nombreuses cellules syncytiales, certaines avec des corps d'inclusion éosinophiles intranucléaires. Le rorqual échoué en France en 1998 présentait des réactions inflammatoires dans le tissu sous-cutané, caractérisées par un infiltrat de neutrophiles, de lymphocytes, de nombreux macrophages et de quelques cellules syncytiales. Ces deux individus avaient des évidences d'infection par un morbillivirus, caractérisées par une réaction immunohistochimique positive spécifique dans les cellules syncytiales et monoclonées. La réaction, intracytoplasmique et/ou intranucléaire, a été obtenue en utilisant des anticorps anti-CDV et/ou anti-PDV. Les autres évidences de l'infection ont été apportées par RT-PCR (résultats similaires à ceux des phoques), l'examen sérologique, par microscopie électronique et par culture cellulaire.

Ces deux individus semblent être les premiers cas décrits d'une maladie associée à l'infection par un morbillivirus chez les mysticètes en général et chez les rorquals communs en

particulier. Cette maladie pourrait représenter une menace pour cette espèce étant donné que des épizooties sévères ont été rapportées chez les mammifères marins infectés par ce virus.

De nombreuses activités humaines ont été à la source de mortalité dans notre échantillon. La capture dans les filets est responsable de la mort de marsouins (18 %) et de phoques (29 %). D'autres interactions avec l'homme, comme les activités de loisir, sont responsables de morts supplémentaires parmi les phoques (20 %). Finalement, un rorqual est mort, bloqué dans des infrastructures portuaires. Des variations de concentrations en certains contaminants étaient liées à l'émaciation. Néanmoins, il n'a pas pu être établi si c'était le processus d'émaciation qui provoquait une hausse des concentrations ou, à l'inverse, les concentrations élevées en contaminants qui étaient responsables de la lésion.

8. SUMMARY

Since 1990, the group MARIN (Marine Animals Research & Intervention Network) deals with the scientific multidisciplinary research of marine mammals stranded or by-caught along the Belgian and northern French coasts. Occasionally, MARIN is associated to the necropsy of marine mammals stranded on the Dutch coast.

The aim of the study was to identify lesions and causes of death of small and large cetaceans as well as pinnipeds on the continental coastlines of the southern North Sea. As it is an area submitted to high human pressure, relations between lesions and toxicological data or human activities such as navigation and commercial fishing were investigated. For each animal groups considered (seals, small and large cetaceans), specific theories were built to explain the mechanism of death.

Small cetaceans :

To illustrate lesions and causes of death of small cetaceans, the harbour porpoise was used as model (Study 1). Between 1990 and 2000, 55 porpoises were necropsied. The annual distribution was very irregular with a major rise in 1999. The most common findings were severe emaciation (60 %) with reduction or absence of fat and muscles atrophy; acute bronchopneumonia (49 %); and extended and severe parasitosis (51 %) consisting of heavy parasite infestations of multiple organs with associated lesions. By-catch in fishing nets was considered to be the cause of death of 18 % of porpoises. The gastro-intestinal tract was usually empty, without evidence of recent feeding (83 %).

Neither immunohistochemistry, nor cell cultures revealed evidence of morbillivirus infection or other viral disease. Serology was negative for *Brucella abortus* in all tested porpoises.

Bronchopneumonia was frequently associated with parasitosis or emaciation, or both. These are chronic, debilitating processes which might predispose to fatal bronchopneumonia.

Pinnipeds :

To illustrate lesions and causes of death of pinnipeds, the harbour seal was used as model (Study 2 and study 3). Thirty-four seals were necropsied and the main findings were emaciation, acute broncho-pneumonia and enteritis. Some lesions suggested trauma such as muscle hematomas, multiple ribs fractures, hemothorax and peritonitis associated with gastric perforation by a foreign body. The gastrointestinal tract was always empty, without evidence of recent feeding for most of seals.

Twelve seals were infected by a morbillivirus since the 1998 when unexpected stranding of 16 seals occurred during the summer, in less than one month. Diagnostic was mainly obtained by immunohistochemistry and RT-PCR. By RT-PCR, fragments of the expected size of about 78 base-pair of the phosphoprotein P gene of the morbillivirus were generated from various frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissues.

Two categories of causes of death can easily be identified on well-preserved carcasses: those related to an acute morbid process, usually associated with non-infectious lesions (by-caught, trauma) and those related to a chronic morbid process, usually associated with infectious lesions. The infectious diseases were frequently associated with morbillivirus infection. Some cases of pneumonia were also related to lung worms infestation. Animals with evidence of infectious diseases were usually emaciated, revealing a long debilitating process. Traumas were related to net entrapment, collision and foreign body ingestion. All those animals were in good nutritional status.

Morbillivirus diseases in seals stranded on the Belgian and northern France coastline since 1998 seems to be the first cases reported in the North Sea since the 1988-1989 outbreak when 18.000 harbour seals died on a population of 25.000.

Large cetaceans

Four sperm whales (Study 4), stranded along the Belgian coast (1994) and three, stranded on the Dutch coast (1995), were necropsied. All were sexually mature males. Significant lesions were ventral skin abrasions, acute skin ulcers, acute ulcerative stomatitides, acute to chronic external otitides, and visceral passive congestion. In addition, sperm whales appeared debilitated (severe weight deficit, blubber thickness reduction, and absence of abdominal fat) and intestinal tracts were almost empty.

Histopathological examinations suggested viral etiology for the integument lesions, but no viral particles were observed by electron microscopy and the presence of morbillivirus antigen was not demonstrated by the immunoperoxidase technique. The poor body conditions and acute integument ulcerative lesions were present before the stranding while ventral skin abrasions and visceral passive congestion were caused by the stranding.

Absence of food in the alimentary tracts, evidence of weight loss and blubber thickness reduction were compatible with an extended presence of the sperm whales in the North Sea, where adequate food is not available. This led to progressive weakness, predisposing the animals to secondary viral diseases. Finally, the coastal configuration of the southern North Sea makes it a trap for sperm whales which have entered the area during their wanderings.

Four fin whales (Study 5) were necropsied, one being stranded on the Belgian coast (1997), two coming ashore in northern part of France (1998; 1999) and one being trapped in a Dutch harbour (2001). All were immature females, aged about 1 year. In 2 cases, necropsy was not performed due to advanced decomposition or lack of heavy equipment to handle carcasses. The 3 stranded whales were emaciated with a reduced blubber layer while the animal trapped in the harbour was in good nutritional status.

Under the microscope, the mesenteric and mammary lymph nodes of the whale stranded on the Belgian coast contained clusters of multinucleated syncytial cells with occasional large eosinophilic intranuclear inclusion bodies. Another whale had an focal acute to subacute inflammatory reactions in the subcutaneous tissues, characterised by neutrophils, lymphocytes, many macrophages and small numbers of syncytial cells. The two whales had evidence of a morbillivirus infection characterized by specific intracytoplasmic and/or intranuclear labelling with anti-CDV and/or anti-PDV monoclonal antibodies in multinucleated syncytial cells and in mononuclear cells. Other evidences of morbillivirus infection were based on RT-PCR (similar than seals), serology, electron microscopy and cell culture.

At the authors' knowledge, it is the first report of specific lesions and antigen presence of morbillivirus infection in a baleen whale and more particularly in fin whale. Such disease could be considered as potential threat on baleen whales, given the frequent association of those viruses with severe epizootics in marine mammals.

Various human activities were associated to the death of marine mammals stranded on the Belgian and northern France coastline. Net entrapment was responsible for the death of porpoises (18 %) and seals (29 %). Other interactions human such as leisure activities were considered as being responsible for additional death of seals (20 %). Finally, one fin whale

was trapped in a harbour. Variations of some contaminants concentration were linked to poor nutritional status but it was not clear if lesions were the cause of differences in contaminant concentrations or the opposite, namely contaminants being responsible for the lesions.

9. BIBLIOGRAPHIE

- ACEVEDO-WHITEHOUSE K.A., CONSTANTINO-CASAS F., AURIOLES-GAMBOA D., RODRIGUEZ-MARTINEZ H.A., GODINEZ-REYES C.R. Hepatic carcinoma with spleen metastasis in a California sea lion from the Gulf of California. *J Wild Dis*, 1999, **35**, 565-568.
- ADDINK M., SMEENK C. The harbour porpoise *Phocoena phocoena* in Dutch coastal waters: analysis of stranding records for the period 1920-1994. *Lutra*, 1999, **41**, 55-79.
- ADDISON R.F. Organochlorines and marine mammals reproduction. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1989, **46**, 360-368.
- AGUILAR A., RAGA J.A. The striped dolphin epizootic in the Mediteranean sea. *Ambio*, 1993, **22** (8), 524-528.
- AGUILAR A., BORRELL A. Abnormally high polychlorinated biphenyl levels in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) affected by the 1990-1992 Mediterranean epizootic. *The Science of the Total Environment*, 1994, **154**, 237-247.
- AGUILAR, A., BORRELL, A. and PASTOR, T. Biological factors affecting variability of persistent pollutant levels in cetaceans. In : edited by Reijnders, P.J.H., Aguilar, A. and Donovan, G.P., *The Journal of Cetaceans Research and Management : Chemical pollutants and cetaceans*. International Whaling Commission : Cambridge, 1999, p. 83-116.
- ANONYMOUS Annex O: Report of the IWC-ASCOBANS working group on harbour porpoises. *J.Cetacean Res.Manage.*, 2000, **2** (suppl.), 297-305.
- APPEL M. Canine distemper epizootic in lions, tigers and leopards in North America. *J Vet Diagn Invest*, 1994, **6**, 277-288.
- BAKER J.R. Pollution associated uterine lesions in greys seals from the Liverpool bay area of the Irish sea. *Vet.Rec.*, 1988, **125**, 303.
- BAKER J.R. Natural causes of death in non-suckling grey seals (*Halichoerus grypus*). *Vet.Rec.*, 1989, **125**, 500-503.
- BAKER J.R. The pathology of phocine distemper. *Sci Total Environ*, 1992a, **115**, 1-7.
- BAKER J.R. Causes of mortality and parasites and incidental lesions in dolphins and whales from British waters. *Vet.Rec.*, 1992b, **130**, 569-572.
- BAKER J.R., MARTIN A.R. Causes of mortality and parasites and incidental lesions in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from British waters. *Vet.Rec.*, 1992, **130**, 554-558.

- BAKER J.R., ROSS H.M. The role of bacteria in phocine distemper. *Sci Total Environ*, 1992, **115**, 9-14.
- BAKER, J.R. By-catches of cetaceans around the coast of Wales. In : edited by Kuiken, T., *Diagnosis of by-catch in cetaceans: proceedings of the second European Cetacean Society workshop on cetacean pathology, Montpellier, France, 2 March 1994*. European Cetacean Society : Saskatoon, Saskatchewan, 1996, p. 35-37.
- BAKER J.R., JEPSON P.D., SIMPSON V.R., KUIKEN T. Causes of mortality and non-fatal conditions among grey seals (*Halichoerus grypus*) found dead on the coasts of England, Wales and the Isle of Man. *Vet.Rec.*, 1998, **142**, 595-601.
- BALBUENA J.A., ASPHOLM P.E., ANDERSEN K.I., BJORKE A. Lung-worm (Nematoda: Pseudaliidae) of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) in Norwegian waters: patterns of colonization. *Parasitology*, 1994, **108**, 343-349.
- BARNETT J.E.F., WOODLEY A.J., HILL T.J., TURNER L. Conditions in grey seal pups (*Halichoerus grypus*) presented for rehabilitation. *Vet.Rec.*, 2000, **147**, 98-104.
- BARRETT T., VISSER I.K.G., MAMAEV L., GOATLEY L., VAN BRESSEM M.F., OSTERHAUS A.D.M.E. Dolphin and porpoise morbilliviruses are genetically distinct from phocine distemper virus. *virology new york*, 1993, **193**;2, 1010-1021.
- BARRETT T. Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores. *Vet.Microbiol.*, 1999, **69**, 3-13.
- BELYKH O., GOLDBERG O., LIKHOSHWAY Y., GRACHEV M. Light, electron and immuno-electron microscopy of organs from seals of Lake Baikal sampled during the morbillivirus infection of 1987-1988. *Europ J Vet Pathol*, 1997, **3**, 133-145.
- BENGSTON J.L., BOVENG P., FRANZEN U., HAVE P., HEIDE-JORGENSEN M.-P., HARKONEN T. Antibodies to canine distemper virus in Antarctic seals. *Mar Mammal Sci*, 1991, **7**, 85-87.
- BENKE H., SIEBERT U., LICK R.R., BANDOMIR B., WEISS R. The current status of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) in German waters. *Arch.Fish.Mar.Res.*, 1998, **46**, 97-123.
- BENNETT P.M., JEPSON P.D., LAW R.J., JONES B.R., KUIKEN T., BAKER J.R., KIRKWOOD J.K. Exposure to heavy metals and infectious disease mortality in harbour porpoises from England and Wales. *Environ Poll*, 2001, **112**, 33-40.
- BERGMAN A., JARPLID B., SVENSSON B.M. Pathological findings indicative of distemper in European seals. *Vet.Microbiol.*, 1990, **23**, 331-341.
- BERTA, A. and SUMICH, J.L. Exploitation and conservation. In : *Marine mammals: evolutionary biology*. Academic press : San Diego, 1999, p. 420-452.
- BIRKUN, A. Complexities of by-catch diagnosis in Black Sea cetaceans. In : edited by Kuiken, T., *Diagnosis of by-catch in cetaceans: proceedings of the second European Cetacean Society workshop on cetacean pathology, Montpellier, France, 2 March 1994*. European Cetacean Society : Saskatoon, Saskatchewan, 1996, p. 12-15.
- BIRKUN A., KUIKEN T., KRIVOKHIZHIN S., HAINES D.M., OSTERHAUS A.D.M.E., VAN DE BILDT M.W.G., JOIRIS C., SIEBERT U. Epizootic of morbilliviral disease in common dolphins (*Delphinus delphis ponticus*) from the Black Sea. *Vet.Rec.*, 1999, **144**, 85-92.
- BLANCHARD T.W., SANTIAGO N.T., LIPSCOMB T.P., GARBER R.L., MCFEE W.E., KNOWLES S. Two novel alphaherpesviruses associated with fatal disseminated infections in Atlantic bottlenose dolphins. *J Wild Dis*, 2001, **37**, 297-305.

- BLIXENKRONE-MØLLER M., BOLT G., DANNEMANN JENSEN T., HARDER T.C., SVANSSON V. Comparative analysis of the attachment protein gene (H) of dolphin morbillivirus. *Virus Res.*, 1996, **40**, 47-56.
- BONNER ,N.W. The natural history of seals. Christopher Helm: London, 1989,
- BORISOVA T.I., LESKOVA V.V., NOVOZHILOV S.S., TITENKO A.M. Virus neutralizing antibodies to morbillivirus in a population of Baikal seals (*Phoca sibirica*). *Vopr Virusol*, 1993, **38**, 28-30.
- BOUQUEGNEAU J.M., DEBACKER V., GOBERT S., NELLISEN J.P. Toxicological investigations on four sperm whales stranded on the Belgian coast: inorganic contaminants. *Bull Inst Roy Sc Nat de Belgique*, 1997, **67-suppl.**, 75-78.(Abstract)
- BOWLES, D. An overview of the concentrations and effects of metals in cetacean species. In : edited by Reijnders, P.J.H., Aguilar, A. and Donovan, G.P., *The Journal of Cetaceans Research and Management : Chemical pollutants and cetaceans*. International Whaling Commission : Cambridge, 1999, p. 125-148.
- BRATTEY J., STENSON G.B. Helminth parasites of the alimentary tract of the harbor porpoise, *Phocoena phocoena* (L.), from Newfoundland and Labrador. *J.Helminthol.Soc. Wash.*, 1995, **62**, 209-216.
- BREUER E.M., KREBS B.H., HOFMEISTER R.J. Metastasizing adenocarcinoma of the stomach in a harbor porpoise, *Phocoena phocoena*. *Dis Aquat Org*, 1989, **7**, 159-163.
- BREW S.D., PERRETT L.L., STACK J.A., MACMILLAN A.P., STAUNTON N.J. Human exposure to *Brucella* recovered from a sea mammal. *Vet.Rec.*, 1999, **144**, 483.
- BROSENS L., JAUNIAUX T., SIEBERT U., BENKE H., COIGNOUL F. Observations on the helminths of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) and common guillemots (*s*) from the Belgian and German coasts. *Vet.Rec.*, 1996, **139**, 254-257.
- BROWN S. Ethical consideration in marine mammal management. *J.A.V.M.A.*, 1999, **214**, 1175-1177.
- BUSBEE, D., TIZARD, I., STOTT, J., FERRICK, D. and OTT-REEVES, E. Environmental pollutants and marine mammal health: the potential impact of hydrocarbons and halogenated hydrocarbons on immune system dysfunction. In : edited by Reijnders, P.J.H., Aguilar, A. and Donovan, G.P., *The Journal of Cetaceans Research and Management : Chemical pollutants and cetaceans*. International Whaling Commission : Cambridge, 1999, p. 223-248.
- CABARD P., CHAUVET B. L'étymologie des noms des mammifères. Eveil Nature: Saint Yrieix sur Charente, 1998,
- CARLSTRÖM J., BERGREN P. Bycatch removal rate of harbour porpoise in the Swedish Skagerrak sea. *Eur Res Cetac*, 1999, **12**, 39.
- CHEVILLE, N.F. Cytopathology of viral diseases. In : *Ultrastructural pathology: an introduction to interpretation*. Iowa State University Press : Ames, 1994, p. 490-615.
- CLOECKAERT A., VERGER J.-M., GRAYON ,M., PAQUET J.Y., GARIN-BASTUJI B., FOSTER G., GODFROID J. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus. *Microbes infect*, 2001, **3**, 729-738.
- COCKRILL W.R. Pathology of the cetacea a veterinary study on whales-Part2. *Brit Vet J*, 1960a, **116**, 179-189.

- COCKRILL W.R. Pathology of the cetacea a veterinary study on whales-Part 1. *Brit Vet J*, 1960b, **116**, 133-144.
- COIGNOUL, F. and JAUNIAUX, T. Basic concepts of veterinary pathology. In : edited by Jauniaux, T., Bouquegneau, J.-M. and Coignoul, F., *Marine mammals, seabirds and pollution of marine systems*. Presses de la Faculté de Médecine Vétérinaire : Liège, 1997, p. 109-115.
- CORNWELL H.J.C., ANDERSON S.S., THOMPSON P.M., MAYER S.J., ROSS H.M., POMEROY P.P., MUNRO R. The serological response of the common seal (*Phoca vitulina*) and the grey seal (*Halichoerus grypus*) to phocine distemper virus as measured by a canine distemper virus neutralisation test. *Sci Total Environ*, 1992, **115**, 99-116.
- COSBY S.L., MCQUAID S., DUFY N., LYONS C., RIMA B.K., ALLAN G.M., MCCULLOUGH S.J., KENNEDY S., SMYTH J.A., MCNEILLY F., CRAIG C., ORVELL C. Characterization of a seal morbillivirus. *Nature*, 1988, **336**, 115-116.
- COTRAN, S.R., KUMAR, V. and ROBBINS, S.L. Neoplasia. In : edited by Cotran, R.S., Kumar, V. and Robbins, S.L., *Pathologic basis of diseases*. W.B. Saunders company : Philadelphia, 1994a, p. 241-303.
- COTRAN, S.R., KUMAR, V. and ROBBINS, S.L. Hemodynamic disorders, thrombosis, and shock. In : edited by Cotran, R.S., Kumar, V. and Robbins, S.L., *Pathologic basis of diseases*. W.B. Saunders company : Philadelphia, 1994b, p. 93-121.
- COUPERUS A.S. Interactions between Dutch midwater trawl and white-sided dolphins (*Lagenorhynchus acutus*) southwest of Ireland. *J Northw Atl Fish Sci*, 1997, **22**, 209-218.
- CULIK B., KOSCHINSKI S., TREGENZA N., ELLIS G. Reactions of harbor porpoises *Phocoena phocoena* and herring *Clupea harengus* to acoustic alarms. *Mar Ecol Prog Ser*, 2001, **211**, 255-260.
- CURRAN M.D., O'LOAN D., RIMA B.K., KENNEDY S. Nucleotide sequence analysis of phocine distemper virus reveals its distinctness from canine distemper virus. *Vet.Rec.*, 1990, **127:17**, 430-431.
- DAOUST P-Y, HAINES D.M., THORSEN J., DUIGNAN P.J., GERACI J.R. Phocine distemper in a harp seal (*Phoca groenlandica*) from the gulf of St. Lawrence, Canada. *J Wild Dis*, 1993, **29**, 114-117.
- DAS K., DEBACKER V., LEPOINT G., GOBERT S., HOLSBEEK L., JOIRIS C., BOUQUEGNEAU J.M. Marine mammals stranded on the Belgian and Dutch coasts: approach of their feeding ecology by stable isotope and heavy metal measurements. *Eur Res Cetac*, 2000, **14**, 219-222.
- DAS, K., DEBACKER, V., PILLET, S. and BOUQUEGNEAU, J.M. Heavy metals in marine mammals. In : *Toxicology of marine mammals*. Taylor and Francis : Washington, 2001a,
- DAS K., JAUNIAUX T., BRUIJNINCKX J., BIRKUN A., JOIRIS C., BOUQUEGNEAU J.M. Trace metal concentrations of harbour porpoises from the North and black sea: relation with their nutritional status. *European Cetacean Society Proceedings*15, 2001b, 4.
- DE GUISE S., LAGACÉ A., BELAND P. Gastric papillomas in eight St. Lawrence beluga whales (*Delphinapterus leucas*). *J Vet Diagn Invest*, 1994a, **6**, 385-388.
- DE GUISE S., LAGACÉ A., BÉLAND P. Tumors in St. Lawrence Beluga Whales (*Delphinapterus leucas*). *Vet. Pathol.*, 1994b, **31**, 444-449.
- DE GUISE S., LAGACE A., BELAND P., GIRARD C., HIGGINS R. Non-neoplastic lesions in beluga whales (*Delphinapterus leucas*) and other marine mammals from the St Lawrence estuary. *J.Comp.Path.*, 1995a, **112**, 257-271.

- DE GUISE S., MARTINEAU D., BELAND P., FOURNIER M. Possible mechanisms of action of environmental contaminants on St. Lawrence beluga whales. *Environ Health Perspect*, 1995b, **103**, 73-77.
- DE SWART R.L., ROSS P.S., VEDDER E.J., TIMMERMAN H.H., HEISTERKAMP S., VAN LOVEREN H., OSTERHAUS A.D.M.E., REIJNDERS P.J.H., VOS J.G. Impairment of immune function in harbor seals (*Phoca vitulina*) feeding on fish from polluted waters. *Ambio*, 1994, **23:2**, 155-159.
- DE SWART R.L., ROSS P.S., TIMMERMAN H.H., HIJMAN W.C., DE RUITER E.M., LIEM A.K.D., BROUWER A., VAN LOVEREN H., REIJNDERS P.J.H., VOS J.G., OSTERHAUS A.D.M.E. Short term fasting does not aggravate immunosuppression in harbour seals (*Phoca vitulina*) with high body burdens of organochlorines. *Chemosphere*, 1995a, **31**, 4289-4306.
- DE SWART R.L., ROSS P.S., TIMMERMAN H.H., VOS H.W., REIJNDERS P.J.H., VOS J.G., OSTERHAUS A.D.M.E. Impaired cellular immune response in harbour seals (*Phoca vitulina*) fed environmentally contaminated herring. *Clin Exp Immunol*, 1995b, **101**, 480-486.
- DE SWART R.L., ROSS P.S., VOS J.G., OSTERHAUS A.D.M.E. Impaired immunity in harbour seals (*Phoca vitulina*) exposed to bioaccumulated environmental contaminants: review of a long-term feeding study. *Environ Health Perspect*, 1996, **104**, 823-828.
- DHERMAIN F., BOMPAR J.-M., CHAPPUIS G., FOLACCI M., POITEVIN F. Epizootie à morbillivirus chez les dauphins bleu-et-blanc *Stenella coeruleoalba* en Méditerranées. *Rec Med Vét*, 1994, **170**, 85-92.
- DI GUARDO G., AGRIMI U., AMADEO D., MCALISKEY M., KENNEDY S. Morbillivirus infection in a striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) from the coast of Italy. *Vet.Rec.*, 1992, **130**, 579-580.
- DI GUARDO G., AGRIMI U., MORELLI L., CARDETI G., TERRACCIANO G., KENNEDY S. Post mortem investigations on cetaceans found stranded on the coasts of Italy between 1990 and 1993. *Vet.Rec.*, 1995, **136**, 439-442.
- DIERAUF, L.A. Marine mammal necropsy specimen collection. In : edited by Dierauf, L.A., *Handbook of marine mammal medicine: health, disease, and rehabilitation*. CRC Press : Boca Raton, 1990a, p. 291-294.
- DIERAUF, L.A. Disposition of marine mammals. In : edited by Dierauf, L.A., *Handbook of marine mammal medicine: health, disease, and rehabilitation*. CRC Press : Boca Raton, 1990b, p. 267-286.
- DIERAUF, L.A. and GAGE, L.J. Gross necropsy of cetaceans and pinnipeds. In : edited by Dierauf, L.A., *Handbook of marine mammal medicine: health, disease, and rehabilitation*. CRC Press : Boca Raton, 1990, p. 285-286.
- DIERAUF L.A. Pinniped forensic, necropsy and tissue collection guide. National oceanic and atmospheric administration National marine fisheries service: 1994,
- DIETZ R., ANSEN C.T., HAVE P., HEIDE-JORGENSEN M.-P. Clue to seal epizootic? *Nature*, 1989a, **338**, 627.
- DIETZ R., HEIDE-JORGENSEN M.-P., HARKONEN T. Mass deaths of harbor seals (*Phoca vitulina*) in Europe. *Ambio*, 1989b, **28**, 258-264.
- DIGUARDO G., AGRIMI U., MORELLI L., CARDETI G., TERRACCIANO G., KENNEDY S. Post mortem investigations on cetaceans found stranded on the coasts of Italy between 1990 and 1993. *Vet.Rec.*, 1995, **Vol 136, Iss 17**, 439-442.
- DOMINGO M., FERRER L., PUMAROLA M., MARCO A.J., PLANA J., KENNEDY S., MCALISKEY M., RIMA B.K. Morbillivirus in dolphins. *Nature*, 1990, **348**, 21.

- DOMINGO M., VISA J., PUMAROLA M., MARCO A.J., FERRER L., RABANAL R., KENNEDY S. Pathologic and immunocytochemical studies of morbillivirus infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Vet.Pathol.*, 1992, **29**, 1-10.
- DOMINGO M., VILAFRANCA M., VISA J., PRATS N., TRUDGETT A., VISSER I.K.G. Evidence for chronic morbillivirus infection in the Mediterranean striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*). *Vet.Microbiol.*, 1995, **44**, 229-239.
- DUIGNAN P.J., GERACI J.R., RAGA J.A., CALZADA N. Pathology of morbillivirus infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from Valencia and Murcia, Spain. *Can.J.Comp.Med.*, 1992, **56**, 242-248.
- DUIGNAN P.J., SADOVE S., SALIKI J.T., GERACI J.R. Phocine distemper in harbour seals (*Phoca vitulina*) from Long Island, New York. *J Wild Dis*, 1993, **29**, 465-469.
- DUIGNAN P.J., SALIKI J.T., ST.AUBIN D.J., HOUSE J.A., GERACI J.R. Neutralizing antibodies to phocine distemper virus in atlantic walruses (*Odobenus rosmanus rosmanus*) from arctic Canada. *J Wild Dis*, 1994, **30**, 90-94.
- DUIGNAN P.J., HOUSE C., GERACI J.R., DUFFY N., RIMA B.K., WALSH M.T., EARLY G., ST.AUBIN D.J., SADOVE S., KOOPMAN H., RHINEHART H. Morbillivirus infection in cetaceans of the western Atlantic. *Vet.Microbiol.*, 1995a, **44**, 241-249.
- DUIGNAN P.J., HOUSE C., GERACI J.R., EARLY G., COPLAND H.G., WALSH M.T., BOSSART G.D., GRAY C., SADOVE S., STAUBIN D.J., MOORE M. Morbillivirus infection in two species of pilot whales (*Globicephala* sp) from the western Atlantic. *Mar Mammal Sci*, 1995b, **Vol 11, Iss 2**, 150-162.
- DUIGNAN P.J., HOUSE C., WALSH M.T., CAMPBELL T., BOSSART G.D., DUFFY N., FERNANDES P.J., RIMA B.K., WRIGHT S., GERACI J.R. Morbillivirus infection in manatees. *Mar Mammal Sci*, 1995c, **Vol 11, Iss 4**, 441-451.
- DUIGNAN P.J., SALIKI J.T., ST.AUBIN D.J., EARLY G., SADOVE S., HOUSE J.A., KOVACS K., GERACI J.R. Epizootiology of morbillivirus infection in North American harbor seals (*Phoca vitulina*) and gray seals (*Halichoerus grypus*). *J Wild Dis*, 1995d, **31**, 491-501.
- DUIGNAN P.J., DUFFY N., RIMA B.K., GERACI J.R. Comparative antibody response in harbour and grey seals naturally infected by a morbillivirus. *Vet.Immunol.Immunopathol.*, 1997a, **55**, 341-349.
- DUIGNAN P.J., NIELSEN O., HOUSE C., KOVACS K.M., DUFFY N., EARLY G., SADOVE S., ST.AUBIN D.J., RIMA B.K., GERACI J.R. Epizootiology of morbillivirus infection in harp, hooded, and ringed seals from the Canadian Arctic and western Atlantic. *J Wild Dis*, 1997b, **33**, 7-19.
- DUINKER J.C., HILLEBRAND M.T.J., ZEINSTRA T., BOON J.P. Individual chlorinated biphenyls and pesticides in tissues of some cetaceans species from the North Sea and the Atlantic ocean; tissue distribution and biotransformation. *Aquatic Mammals*, 1989, **15**, 95-124.
- DUNGWORTH, D.L. The respiratory system. In : edited by Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C. and Palmer, N., *Pathology of domestic animals*. Academic Press : San Diego, 1993, p. 617-624.
- DUNN, J.L., BUCK, J.D. and ROBECK, T.R. Bacterial diseases of cetaceans and pinnipeds. In : edited by Dierauf, L.A. and Gulland, M.D., *Handbook of marine mammal medicine*. CRC press : Boca Raton, 2001, p. 309-335.
- EVANS P.G.H. Status review of Cetaceans in UK waters. Report for UK Department of the Environment: 1992,

- FAULKNER J., MEASURES L.N., WHORISKEY F.G. *Stenurus minor* (Metastrongyloidea: Pseudaliidae) infections of the cranial sinuses of the harbour porpoises, *Phocoena phocoena*. *Can.J.Zool.*, 1998, **76**, 1209-1216.
- FORSYTH M.A., KENNEDY S., WILSON S., EYBATOV T., BARRETT T. Canine distemper virus in a Caspian seal. *Vet.Rec.*, 1998, **143**, 662-664.
- FOSTER G., JAHANS K.L., REID R.J., ROSS H.M. Isolation of *Brucella* species from cetaceans, seals and an otter. *Vet.Rec.*, 1996, **138**, 583-586.
- GAMBELL, R. Fin whale *Balaenoptera physalus* (Linnaeus, 1758). In : edited by Ridgway, S.H. and Sir Harrison, R., *Handbook of marine mammals, volume 3 The Sirenians and baleen whales*. Academic Press : San Diego, 1985, p. 171-192.
- GARCÍA HARTMANN, M., COUPERUS, A.S. and ADDINK, M. The diagnosis of by-catch: preliminary results of research in the Netherlands. In : edited by Kuiken, T., *Diagnosis of by-catch in cetaceans: Proceedings of the second European Cetacean Society workshop on cetacean pathology, Montpellier, France, 2 March 1994*. European Cetacean Society newsletter 26 : Saskatoon, 1996, p. 16-23.
- GARCÍA HARTMANN, M. Pathology of marine mammals. In : edited by Jauniaux, T., Coignoul, F. and Bouquegneau, J.-M., *Marine Mammals, Seabirds, and Pollution of Marine Systems*. Presses de la Faculté de Médecine Vétérinaire : Liège, 1997, p. 117-149.
- GARNER M.M., LAMBOURN D.M., JEFFRIES S.J., HALL P.B., RHYAN J.C., EWALT D.R., POLZIN L.M., CHEVILLE N.F. Evidence of *Brucella* in *Parafilaroides* lungworms in a Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*). *J Vet Diagn Invest*, 1997, **9**, 298-303.
- GEARIN P.J., GOSHO M.E., LAAKE J.L., COOKE L., DELONG R.L., HUGHES K.M. Experimental testing of acoustic alarms (pingers) to reduce bycatch of harbour porpoise, *Phocoena phocoena*, in the state of Washington. *J.Cetacean Res.Manage.*, 2000, **2**, 1-9.
- GERACI J.R., ST.AUBIN D.J., BARKER I.K., WEBSTER W.A., HINSHAW V.S., BEAN W.J., RUHNKE H.L., PRESCOTT J.H., EARLY G., BAKER A.S., MADOFF S., SCHOOLEY R.T. Mass mortality of harbor seals: pneumonia associated with influenza A virus. *Science*, 1982, **215**, 1129-1131.
- GERACI J.R., LOUNSBURY V.J. Marine mammals ashore : a field guide for strandings. Texas A&M sea grant publication: Galveston, 1993,
- GERACI, J.R., HARWOOD, J. and LOUNSBURY, V.J. Marine mammal die-offs: causes, investigations, and issues. In : edited by Twiss, J.R. and Randall, R.R., *Conservation and management of marine mammals*. Smithsonian institution press : Washington, 1999, p. 367-395.
- GERBER J.A., ROLETTO J., MORGAN L.E., SMITH D.M., GAGE L.J. Findings in pinnipeds stranded along the central and northern California coast, 1984-1990. *J Wild Dis*, 1993, **29(3)**, 423-433.
- GOODHART C.B. Did virus transfer from harp seals to common seals? *Nature*, 1988, **336**, 21.
- GRACHEV M., KUMAREV V.P., MAMAEV L.V., ZORIN V.L., BARANOVA L.V., DENIKINA N.N., BELIKOV S.I., PETROV E.A., KOLESNIK V.S., KOLESNIK R.S., DOROFEEV V.M., BEIM A.M., KUDELIN V.N., NAGEIVA F.G., SIDOROV V.N. Distemper virus in Baikal seals. *Nature*, 1989, **338**, 209.
- GRIFFIN, D.E. and BELLINI, J. Measles virus. In : edited by Fields, B.N., Knipe, D.M. and Howley, P.M., *Virology*. Raven Publishers : Philadelphia, 1996, p. 1267-1312.

- GUITART R., GUERRERO X., SILVESTRE A.M., GUTIÉRREZ J.M., MATEO R. Organochlorine residues in tissues of striped dolphins affected by the 1990 Mediterranean epizootic: relationships with the fatty acid composition. *Arch Environ Contam Toxicol*, 1996, **30**, 79-83.
- GULLAND F.M.D., TRUPKIEWICZ J.G., SPRAKER T.R., LOWENSTINE L.J. Metastatic carcinoma of probable transitional cell origin in 66 free-living California sea lions (*Zalophus californianus*), 1979 to 1994. *J Wild Dis*, 1996, **32**, 250-258.
- GULLAND, F.M.D., LOWENSTINE, L.J. and SPRAKER, T. Noninfectious diseases. In : edited by Dierauf, L.A. and Gulland, M.D., *Handbook of marine mammal medicine*. CRC press : Boca Raton, 2001, p. 521-547.
- HALL A., LAW R.J., WELLS D.E., ROSS H.M., KENNEDY S., ALLCHIN C.R., CAMPBELL L.A., POMEROY P.P. Organochlorine levels in common seals (*Phoca vitulina*) which were victims and survivors of the 1988 phocine distemper epizootic. *Sci Total Environ*, 1992, **115**, 145-162.
- HAMMOND P., HEIMLICH-BORANS S., BENKE H., BERGGREN P., COLLET A., HEIDE-JORGENSEN M.-P., LEOPOLD M.F., OIEN N. The distribution and abundance of harbour porpoises and small cetaceans in the North Sea and adjacent waters. *Eur Res Cetac*, 1995, **9**, 121.
- HARDER T.C., WILLHAUS T., FREY H., LIESS B. Morbillivirus infections of seals during the 1988 epidemic in the Bay of Heligoland: III. Transmission studies of cell culture-propagated phocine distemper virus in harbour seals (*Phoca vitulina*) and a grey seal (*Halichoerus grypus*): clinical, virological and serological results. *Journal of Veterinary Medicine Serie B*, 1990, **37**, 641-650.
- HARDER T.C., WILLHAUS T., LEIBOLD W., LIESS B. Investigations on course and outcome of phocine distemper virus infection in harbour seals (*Phoca vitulina*) exposed to polychlorinated biphenyls. *J Vet Med*, 1992, **39**, 19-31.
- HARDER T.C., STEDE M., WILLHAUS T., SCHWARZ J., HEIDEMANN G., LIESS B. Morbillivirus antibodies of maternal origin in harbour seal pups (*Phoca vitulina*). *Vet. Rec.*, 1993, **132:25**, 632-633.
- HARWOOD J., CARTER S.D., HUGHES D.E., BELL S.C., BAKER J.R., CORNWELL H.J.C. Seal disease predictions. *Nature*, 1989, **339**, 6227.
- HARWOOD J. What killed the monk seals? *Nature*, 1998, **393**, 17-18.
- HAVE P., NIELSEN J., BOTNER A. The seal death in Danish waters 1988 2. Virological studies. *Acta vet.scand.*, 1991, **32**, 211-219.
- HEIDE-JORGENSEN M.-P., HARKONEN T., DIETZ R., THOMPSON P.M. Retrospective of the 1988 European seal epizootic. *Dis Aquat Org*, 1992, **13**, 37-62.
- HEJE N.-I., HENRIKSEN P., AALBOEK B. The seal death in Danish waters 1988 1. Pathological and bacteriological studies. *Acta vet.scand.*, 1991, **32**, 205-210.
- HELLE E. PCB levels correlated with pathological changes in seal uteri. *Ambio*, 1976, **5**, 261-263.
- HENDERSON G., TRUDGETT A., LYONS C., RONALD K. Demonstration of antibodies in archival sera from Canadian seals reactive with a European isolate of phocine distemper virus. *Sci Total Environ*, 1992, **115**, 93-98.
- HIGGINS R. Bacteria and fungi of marine mammals: a review. *Can Vet J*, 2000, **41**, 105-116.
- HINSHAW V.S., BEAN W.J., GERACI J.R., FIORELLI P., EARLY G., WEBSTER R.G. Characterization of two influenza A viruses from a pilot whale. *J Virol*, 1986, **58**, 655-656.

- HOWARD, E.B., BRITT, J.O. and MATSUMODO, G. Parasitic diseases. In : edited by Howard, E.B., *Pathobiology of marine mammal diseases*. CRC Press : Boca Raton, Florida, 1983, p. 119-232.
- HUGHES D.E., CARTER S.D., ROBINSON I., CLARKE D.D., CLARKE C.J. Anti-canine distemper virus antibodies in common and grey seals. *Vet.Rec.*, 1992, **130**, 449-450.
- HYVÄRINEN H., SIPILÄ T. Heavy metals and high pup mortality in the Saimaa ringed seal population in Eastern Finland. *Mar.Pollut.Bull.*, 1984, **15**, 335-337.
- JACQUES T. Science and conservation in whale strandings: the role of the public authorities. *Bull Inst Roy Sc Nat de Belgique*, 1997, **67-suppl.**, 127-133.
- JAHANS K.L., FOSTER G., BROUGHTON E.S. The characterisation of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *Vet.Microbiol.*, 1997, **16**, 373-382.
- JAUNIAUX T., NOWOSAD A., GARCÍA HARTMANN M., COIGNOUL F. Tissue examination for diatom detection in by-caught cetaceans. *Proceedings of the Comparative Respiratory Society*, 1997, **XV annual conference**, (Abstract)
- JAUNIAUX, T., GARCÍA HARTMANN, M. and COIGNOUL, F. Postmortem examination and tissues sampling of sperm whales *Physeter macrocephalus*. In : edited by Tougaard, S. and Kinze, C.C., *Sperm whale strandings in the North Sea : the event-the action-the aftermath*. Fisheries and Maritime Museum : Esbjerg, 1999,
- JEPSON P.D., BREW S., MACMILLAN A.P., BAKER J.R., ETT J., KIRKWOOD J.K., KUIKEN T., ROBINSON I., SIMPSON V.R. Antibodies to *Brucella* in marine mammals around the coasts of England and Wales. *Vet.Rec.*, 1997, **141**, 513-515.
- JEPSON P.D., BENNETT P.M., ALLCHIN C.R., LAW R.J., KUIKEN T., BAKER J.R., ROGAN E., KIRKWOOD J.K. Investigating potential associations between chronic exposure to polychlorinated biphenyls and infectious disease mortality in harbour porpoises from England and Wales. *The Science of the Total Environment*, 1999, **243/244**, 339-348.
- JEPSON P.D., BAKER J.R., KUIKEN T., SIMPSON V.R., KENNEDY S., BENNETT P.M. Pulmonary pathology of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded in England and Wales between 1990 to 1996. *Vet.Rec.*, 2000, **146**, 721-728.
- JOIRIS C., HOLSBEEK L., BOUQUEGNEAU J.M., BOSSICART M. Mercury contamination of the harbour porpoise *Phocoena phocoena* and other cetaceans from the North Sea and the Kattegat. *water, air and soil pollution*, 1991, **56**, 283-293.
- JOIRIS C., HOLSBEEK L., BOSSICART M., TAPIA G. Mercury and organochlorines in four sperm whales stranded on the Belgian coast, November 1994. *Bull Inst Roy Sc Nat de Belgique*, 1997, **67-suppl.**, 69-73.(Abstract)
- KASTELEIN R.A., DE HAAN D. Detection distances of bottom-set gillnets by harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) and bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Mar Environ Res*, 2000, **49**, 359-375.
- KENNEDY S., SMYTH J.A., CUSH P.F., MCCULLOUGH S.J., ALLAN G.M., MCQUAID S. Viral distemper now found in porpoises. *Nature*, 1988a, **336**, 21.
- KENNEDY S., SMYTH J.A., MCCULLOUGH S.J., ALLAN G.M., MCNEILLY F., MCQUAID S. Confirmation of cause of recent seal deaths. *Nature*, 1988b, **335**, 404.

- KENNEDY S., SMYTH J.A., CUSH P.F., DUIGNAN P.J., PLATTEN M., MCCULLOUGH S.J., ALLAN G.M. Histopathologic and immunocytochemical studies of distemper in seals. *Vet.Pathol.*, 1989, **26**, 97-103.
- KENNEDY S., SMYTH J.A., CUSH P.F., MCALISKEY M., MCCULLOUGH S.J., RIMA B.K. Histopathological and immunocytochemical studies of distemper in harbour porpoises. *Vet.Pathol.*, 1991, **28**, 1-7.
- KENNEDY S., KUIKEN T., ROSS H.M., MCALISKEY M., MOFFETT D., MCNIVEN C.M., CAROLE M. Morbillivirus infection in two common porpoises (*Phocoena phocoena*) from the coasts of England and Scotland. *Vet.Rec.*, 1992a, **131**, 286-290.
- KENNEDY S., LINDSTEDT I.J., MCALISKEY M., MCCONNELL S., MCCULLOUGH S.J. Herpesviral encephalitis in a harbour porpoise (*Phocoena phocoena*). *J.Zoo.Wildl.Med.*, 1992b, **23**, 374-379.
- KENNEDY S. Morbillivirus infections in aquatic mammals. *J.Comp.Path.*, 1998, **119**, 201-225.
- KENNEDY, S. Morbilliviral infections in marine mammals. In : edited by Reijnders, P.J.H., Aguilar, A. and Donovan, G.P., *The Journal of Cetaceans Research and Management : Chemical pollutants and cetaceans*. International Whaling Commission : Cambridge, 1999, p. 267-273.
- KENNEDY S., KUIKEN T., JEPSON P.D., DEAVILLE R.C., FORSYTH M.A., BARRETT T., VAN DE BILDT M.W.G., OSTERHAUS A.D.M.E., EYBATOV T., DUCK A., KYDYRMANOV A., MITROFANOV I., WILSON S. Mass die-off of Caspian seals caused by canine distemper virus. *Emerging Infectious Diseases*, 2000, **6**, 637-639.
- KENNEDY-STOSKOPF, S. Viral diseases. In : edited by Dierauf, L.A. and Gulland, M.D., *Handbook of marine mammal medicine*. CRC press : Boca Raton, 2001, p. 285-307.
- KINZE, C. Incidental catches of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) in Danish waters, 1986-1989. In : edited by Perrin, W.F., Donovan, G.P. and Barlow, J., *Gillnets and cetaceans*. International Whaling Commission, special issue 15 : Cambridge, 1994, p. 183-187.
- KIRKWOOD J.K., BENNETT P.M., JEPSON P.D., KUIKEN T., SIMPSON V.R., BAKER J.R. Entanglement in fishing gear and other causes of death in cetaceans stranded on the coasts of England and Wales. *Vet.Rec.*, 1997, **141**, 94-98.
- KLEIVANE L., SKAARE J.U., BJORGE A., DE RUITER E.M., REIJNDERS P.J.H. Organochlorine pesticide residue and PCBs in harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) incidentally caught in Scandanavian waters. *Environ Poll*, 1995, **89**, 137-146.
- KNIERIEM, A. and GARCÍA HARTMANN, M. Histopathology of the lungs of bycaught white-sided dolphins (*Leucopleurus acutus*). In : edited by Garcia Hartmann, M., *Lung pathology: Proceedings of the third European Cetacean Society workshop on cetacean pathology, Lisbon, Portugal, 14 2 March 1996*. European Cetacean Society newsletter 37 : Duisburg, 2001, p. 41-44.
- KRAFFT A., LICHY J.H., LIPSCOMB T.P., KLAUNBERG B.A., KENNEDY S., TAUBENBERGER J.K. Postmortem diagnosis of morbillivirus infection in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Atlantic and Gulf of Mexico epizootics by polymerase chain reaction-based assay. *J Wild Dis*, 1995, **31**, 410-415.
- KRAUS S.D., READ A.J., SOLOW A., BALDWIN K., SPRADLIN T., ANDERSON E., WILLIAMSON J. Acoustic alarms reduce porpoise mortality. *Nature*, 1997, **388**, 525.
- KROGSRUD J., EVENSEN O., HOLT G., HOIE S., MARKUSSEN N.H. Seal distemper in Norway in 1988 and 1989. *Vet.Rec.*, 1990, **126**, 460-461.

- KUEHL D.W., HAEBLER R. Organochlorine, organobromine, metal, and selenium residues in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) collected during an unusual mortality event in the gulf of Mexico, 1990. *Arch Environ Contam Toxicol*, 1995, **28**, 494-499.
- KUIKEN T., GARCÍA HARTMANN M. Proceedings of the first European Cetacean Society workshop on cetacean pathology: dissection techniques and tissue sampling. ECS Newsletter #17 special issue: 1991,
- KUIKEN T., BENNETT P.M., ALLCHIN C.R., KIRKWOOD J.K., BAKER J.R., LOCKYER C., WALTON M.J., SHELDRIK M.C. PCBs, cause of death and body condition in harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) from British waters. *Aquat.Toxicol.*, 1994a, **28**, 13-28.
- KUIKEN T., SIMPSON V.R., ALLCHIN C.R., BENNETT P.M., CODD J.A, HARRIS E.A., HOWES G.J., KENNEDY S., KIRKWOOD J.K., LAW R.J., MERRET N.R., PHILLIPS S. Mass mortality of common dolphins (*Delphinus delphis*) in south west England due to incidental capture in fishing gear. *Vet.Rec.*, 1994b, **22**, 81-89.
- KUIKEN, T. Review of the criteria for the diagnosis of by-catch in cetaceans. In : edited by Kuiken, T., *Diagnosis of by-catch in cetaceans: proceedings of the second European Cetacean Society workshop on cetacean pathology, Montpellier, France, 2 March 1994*. European Cetacean Society : Saskatoon, Saskatchewan, 1996a, p. 38-43.
- KUIKEN, T. Pathology of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from the coast of England, suspected of by-catch. In : edited by Kuiken, T., *Diagnosis of by-catch in cetaceans: proceedings of the second European Cetacean Society workshop on cetacean pathology, Montpellier, France, 2 March 1994*. European Cetacean Society : Saskatoon, Saskatchewan, 1996b, p. 31-34.
- LAMB, R.A. and KOLAKOFSKY, D. *Paramyxoviridae*: The viruses and their replication. In : edited by Fields, B.N., Knipe, D.M. and Howley, P.M., *Virology*. Raven Publishers : Philadelphia, 1996, p. 1177-1204.
- LAMBERTSEN R.H. Disease of the common fin whale (*Balaenoptera physalus*): crassicaudiosis of the urinary system. *J.Mammalogy*, 1986, **67**, 353-366.
- LAMBERTSEN R.H., KOHN B.A. Unusual multisystemic pathology in a sperm whale bull. *J Wild Dis*, 1987, **23**(3), 510-514.
- LAMBERTSEN R.H. Natural disease problems of the sperm whale. *Bull Inst Roy Sc Nat de Belgique*, 1997, **67**, 105-112.
- LARSEN, B.H. and HOLM, C.N. Microscopical examination of bronchial fluid from harbour porpoises (*Phocoena phocoena* L.) for the presence of marine flora and fauna and mineral grains as a possible method to diagnose by-catch. In : edited by Kuiken, T., *Diagnosis of by-catch in cetaceans: proceedings of the second European Cetacean Society workshop on cetacean pathology, Montpellier, France, 2 March 1994*. European Cetacean Society : Saskatoon, Saskatchewan, 1996, p. 4-9.
- LAW R.J., FILEMAN C.F., HOPKINS A.D., BAKER J.R., HARWOOD J., JACKSON D.B., KENNEDY S., MARTIN A.R., MORRIS R.J. Concentrations of trace metals in the livers of marine mammals (seals, porpoises and dolphins) from waters around the British Isles. *Mar.Pollut.Bull.*, 1991, **22**, 183-191.
- LAW R.J., MORRIS R.J., ALLCHIN C.R., JONES B.R. Metals and chlorobiphenyls in tissues of sperm whales (*Physeter macrocephalus*) and other cetaceans species exploiting similar diets. *Bull Inst Roy Sc Nat de Belgique*, 1997, **67-suppl.**, 79-89.
- LICK R.R., BANDOMIR KRISCHAK B., STEDE M., WULF J., BENKE H. Case report on two large whales (*Megaptera novaenglia* and *Physeter macrocephalus*) in the German part of the North Sea. *Eur Res Cetac*, 1996, **9**, 162-163.

- LIPSCOMB T.P., KENNEDY S., MOFFETT D., FORD B.K. Morbilliviral disease in an Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) from the Gulf of Mexico. *J Wild Dis*, 1994a, **30**(4), 572-576.
- LIPSCOMB T.P., SCHULMAN F.Y., MOFFETT D., KENNEDY S. Morbilliviral disease in Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the 1987-1988 epizootic. *J Wild Dis*, 1994b, **30**, 567-571.
- LIPSCOMB T.P., KENNEDY S., MOFFETT D., KRAFFT A., KLAUNBERG B.A., LICHY J.H., REGAN G.T., WORTHY G.A.J., TAUBENBERGER J.K. Morbilliviral epizootic in bottlenose dolphins of the gulf of Mexico. *J Vet Diagn Invest*, 1996, **8**, 283-290.
- LOCKYER, C. Aspects of the morphology, body fat condition and biology of the harbour porpoise, *Phocoena phocoena*, in British waters. In : edited by Bjorge, A. and Donovan, G.P., *Biology of the Phocoenids*. The International Whaling Commission : Cambridge, 1995, p. 199-209.
- LYONS C., WELSH M.J., THORSEN J., RONALD K., RIMA B.K. Canine distemper virus isolated from a captive seal. *Vet.Rec.*, 1993, **132**, 487-488.
- MAHY B.W.J., BARRETT T., EVANS S., ANDERSON E.C., BOSTOCK C.J. Characterization of a seal morbillivirus. *Nature*, 1988, **336**, 115.
- MAMAEV L.V., DENIKINA N.N., BELIKOV S.I., VOLCHKOV V.E., VISSER I.K.G., FLEMING M., KAI C., HARDER T.C., LIESS B., OSTERHAUS A.D.M.E., BARRETT T. Characterisation of morbilliviruses isolated from Lake Baikal seals (*Phoca sibirica*). *Vet.Microbiol.*, 1995, **Vol 44, Iss 2-4**, 251-259.
- MAMAEV L.V., VISSER I.K.G., BELIKOV S.I., DENIKINA N.N., HARDER T.C., GOATLEY L., RIMA B.K., EDGINTON B., OSTERHAUS A.D.M.E., BARRETT T. Canine distemper virus in lake Baikal seals (*Phoca sibirica*). *Vet.Rec.*, 1996, **138**, 437-439.
- MANGEL, M. and HOFMAN, R.J. Ecosystems: patterns, processes, and paradigms. In : edited by Twiss, J.R. and Randall, R.R., *Conservation and management of marine mammals*. Smithsonian institution press : Washington, 1999, p. 87-98.
- MARKUSSEN N.H., HAVE P. Phocine distemper virus infection in harp seals (*Phoca groenlandica*). *Mar Mammal Sci*, 1992, **8**, 19-26.
- MARTINEAU D., LAGACE A., BELAND P., HIGGINS R., ARMSTRONG D., SHUGART L.R. Pathology of stranded Beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St Lawrence Estuary, Quebec, Canada. *J.Comp.Path.*, 1988, **98**, 287-311.
- MARTINEAU D., DE GUISE S., FOURNIER M., SHUGART L.R., GIRARD C., LAGACÉ A., BELAND P. Pathology and toxicology of beluga whales from the St. Lawrence estuary, Quebec, Canada. Past, present and future. *The Science of the Total Environment*, 1994, **154**, 201-215.
- MARTINEAU, D., LAIR, S., DE GUISE, S., LIPSCOMB, T.P. and BELAND, P. Cancer in beluga whales from the St Lawrence estuary, Quebec, Canada: a potential biomarker of environmental contamination. In : edited by Reijnders, P.J.H., Aguilar, A. and Donovan, G.P., *The Journal of Cetaceans Research and Management : Chemical pollutants and cetaceans*. International Whaling Commission : Cambridge, 1999, p. 249-265.
- MCCULLOUGH S.J., MCNEILLY F., ALLAN G.M., KENNEDY S., SMYTH J.A., COSBY S.L., MCQUAID S., RIMA B.K. Isolation and characterization of a porpoise morbillivirus. *Arch Virol*, 1991, **118**, 247-252.
- MCGOUTRY C. Species jump may be responsible for seals' virus infection. *Nature*, 1988, **335**, 3.

- MEASURES, L.N. Lungworms of marine mammals. In : edited by Samuel, W., Pybus, M. and Kocan, A., *Parasitic diseases of wild mammals*. Manson : London, 2001, p. 279-300.
- MEURENS F., DELAUNOIS A., BECKERS J-F., GUSTIN P. Les xéno-oestrogènes et leur impact sur l'environnement. *Ann Med Vet*, 2000, **145**, 53-64.
- MIKAELIAN I., TREMBLAY M-P., MONTPETIT C., TESSARO S.V., CHO H.J., HOUSE C., MEASURES L., MARTINEAU D. Seroprevalence of selected viral infections in a population of beluga whales (*Delphinapterus leucas*) in Canada. *Vet.Rec.*, 1999, **144**, 50-51.
- MILLER W.G., ADAMS L.G., FICHT T.A., CHEVILLE N.F., PAYEUR J.P., HARLEY D.R., HOUSE C., RIDGWAY S.H. *Brucella*-induced abortions and infection in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *J.Zoo.Wildl.Med.*, 1999, **30**, 100-110.
- MITCHELL S.H., KENNEDY S. Tissue concentrations of organochlorine compounds in common seals from the coast of Northern Ireland. *Sci Total Environ*, 1992, **115**, 163-177.
- MORIMITSU T., NAGAI T., IDE M., ISHII A., KOONO M. Parasitic octavus neuropathy as a cause of mass stranding of Odontoceti. *J Parasitol*, 1986, **72**, 469-472.
- MORIMITSU T., NAGAI T., IDE M., KAWANO H., NAICHUU A., KOONO M., ISHII A. Mass stranding of odontoceti caused by parasitogenic eighth cranial neuropathy. *J Wild Dis*, 1987, **23**, 586-590.
- MORRIS R.J., LAW R.J., ALLCHIN C.R., KELLY C.A., FILEMAN C.F. Metals and organochlorines in dolphins and porpoises of Cardigan Bay, West Wales. *Mar.Pollut.Bull.*, 1989, **20**, 512-523.
- MOUTOU F. Epizootie virale chez le phoque veau marin (*Phoca vitulina*) en 1988. Aspects épidémiologiques. *Vet Res*, 1993, **24**, 159-167.
- MUNRO R., ROSS H.M., CORNWELL C., GILMOU R J. Disease conditions affecting common seals (*Phoca vitulina*) around the Scottish mainland, September-November 1988. *Sci Total Environ*, 1992, **115**, 67-82.
- MUNSON L., CALZADA N., KENNEDY S., SORENSEN T.B. Luteinized ovarian cysts in Mediterranean striped dolphins. *J Wild Dis*, 1998, **34**, 656-660.
- MÜLLER G., SIEBERT U., WÜNSCHMANN A., ARTELT A., BAUMGARTNER W. Immunohistochemical and serological investigation of morbillivirus infection in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from the German Baltic and North Sea. *Vet.Microbiol.*, 2000, **75**, 17-25.
- NEEDHAM, D.J. Cetacean strandings. In : edited by Fowler, M.E., *Zoo and wild animal medicine current therapy*. W.B. Saunders Company : Philadelphia, 1993, p. 415-425.
- NIELSEN O., STEWART R.E.A., MEASURES L., DUIGNAN P.J., HOUSE C. A morbillivirus antibody survey of Atlantic walrus, narwhal and beluga in Canada. *J Wild Dis*, 2000, **36**, 508-517.
- NIELSEN O., STEWART R.E.A., NIELSEN K., MEASURES L., DUIGNAN P.J. Serologic survey of *Brucella* spp. antibodies in some marine mammals of north America. *J Wild Dis*, 2001, **37**, 89-100.
- NORTHRIDGE S.P. Etude des interactions entre les mammifères marins et les pêcheries au niveau mondial. *FAO Doc Tech Pêches*, 1985, **251**,
- NORTHRIDGE S.P. Mise à jour de l'étude des interactions entre les mammifères marins et les pêcheries au niveau mondial. *FAO Doc Tech Pêches*, 1992, **251**,

- NORTHRIDGE, S.P. and HOFMAN, R.J. Marine mammal interactions with fisheries. In : edited by Twiss, J.R. and Randall, R.R., *Conservation and management of marine mammals*. Smithsonian institution press : Washington, 1999, p. 99-119.
- NOEL L. The work of media in whale strandings. *Bull Inst Roy Sc Nat de Belgique*, 1997, **67-suppl.**, 123-126.
- NUNOYA T., TAJIMA M., ISHIKAWA Y., SAMEJIMA T., ISHIKAWA H., HASEGAWA K. Occurrence of a canine distemper-like disease in aquarium seals. *Jpn.J.Vet.Sci.*, 1990, **52**, 469-477.
- O'HARA, T.M. and O'SHEA, T.J. Toxicology. In : edited by Dierauf, L.A. and Gulland, M.D., *Handbook of marine mammal medicine*. CRC press : Boca Raton, 2001, p. 471-520.
- O'SHEA T.J. PCBs not to blame. *Science*, 2000, **288**, 1965-1966.
- OSTERHAUS A.D.M.E., YANG H., SPIJKERS H.E., GROEN J., TEPPEMA J.S., VAN STEENIS G. The isolation and partial characterization of a highly pathogenic herpesvirus from the harbor seal (*Phoca vitulina*). *Arch Virol*, 1985, **86**, 239-251.
- OSTERHAUS A.D.M.E. Seal death. *Nature*, 1988, **334**, 301-302.
- OSTERHAUS A.D.M.E., GROEN J., DE VRIES I., UYTDEHAAG F.G.C.M., KLINGEBORN B., ZARNKE R. Canine distemper virus in seals. *Nature*, 1988, **335**, 403-404.
- OSTERHAUS A.D.M.E., VEDDER E.J. Identification of virus causing recent seal deaths. *Nature*, 1988, **335**, 20.
- OSTERHAUS A.D.M.E., GROEN J., UYTDEHAAG F.G.C.M., VISSER I.K.G., V.D.BILDT M.W.G., BERGMAN A., KLINGEBORN B. Distemper virus in Baikal seals. *Nature*, 1989, **339**, 209-210.
- OSTERHAUS A.D.M.E., GROEN J., NIESTERS H., VAN DE BILDT M.W.G., MARTINA B., VEDDER E.J., VOS J.G., VAN EGMOND H., ABOU SIDI B., ELY OULD BARHAM M. Morbillivirus in monk seal mass mortality. *Nature*, 1997, **388**, 838-839.
- OSTERHAUS A.D.M.E., RIMMELZWAAN G.F., MARTINA B.E.E., BESTEBROER T.M., FOUCHIER R.A.M. Influenza B virus in seals. *Science*, 2000, **288**, 1051-1053.
- POHLMAYER G., POHLENZ J., LIEBLER E. Alterations of the gut associated lymphoid tissue (GALT) in harbor seals (*Phoca vitulina vitulina*) during the epidemic in 1988. *Schweiz.arch.Tierheilk.*, 1990, **132**, 453-454.
- POHLMAYER G., POHLENZ J., WOHLSEIN P. Intestinal lesions in experimental phocine distemper : light microscopy, immunohistochemistry and electron microscopy. *J.Comp.Path.*, 1993, **109**, 57-69.
- RAGA, J.A. Parasitology of marine mammals. In : edited by Jauniaux, T., Coignoul, F. and Bouqueneau, J.-M., *Marine Mammals, Seabirds, and Pollution of Marine Systems*. Presses de la Faculté de Médecine Vétérinaire : Liège, 1997, p. 67-90.
- RAMADE F. Dictionnaire encyclopédique des pollutions. Ediscience international: Paris, 2000,
- READ A.J. Estimation of body condition in harbour porpoises, *Phocoena phocoena*. *Can.J.Zool.*, 1990, **68**, 1962-1966.
- READ, A.J. Harbour porpoise *Phocoena phocoena* (Linnaeus, 1758). In : edited by Ridgway, S.H. and Sir Harrison, R., *Handbook of marine mammals, volume 6 : The second book of dolphins and the porpoises*. Academic Press : San Diego, 1999, p. 323-355.

- REDDY M., REIF J.S., BACHAND A., RIDGWAY S.H. Opportunities for using Navy marine mammals to explore associations between organochlorine contaminants and unfavorable effects on reproduction. *The Science of the Total Environment*, 2001, **274**, 171-182.
- REIDARSON T.H., MCBAIN J., HOUSE C., KING D.P., STOTT J.L., KRAFFT A., TAUBENBERGER J.K., HEYNING J., LIPSCOMB T.P. Morbillivirus infection in stranded common dolphins from the Pacific Ocean. *J Wild Dis*, 1998, **34**, 771-776.
- REIJNDERS P.J.H. Reproductive failure in common seals feeding on fish from polluted coastal waters. *Nature*, 1986, **324**, 456-457.
- REIJNDERS P.J.H., LEOPOLD M.F., CAMPHUYSEN C.J., HEESSEN H.J.L., KASTELEIN R.A. The status of the harbour porpoise, *Phocoena phocoena*, in Dutch waters and the state of related research in the Netherlands: an overview. *Rep.Int.Whal.Comm.*, 1996, **46**, 607-611.
- REIJNDERS, P.J.H., DONOVAN, G.P., AGUILAR, A. and BJORGE, A. Report of the workshop on chemical pollution and cetaceans. In : edited by Reijnders, P.J.H., Aguilar, A. and Donovan, G.P., *The Journal of Cetaceans Research and Management : Chemical pollutants and cetaceans*. International Whaling Commission : Cambridge, 1999, p. 1-42.
- RHYAN J.C., GIDLEWSKI T., EWALT D.R., HENNAGER S.G., LAMBOURNE D.M., OLSEN S.C. Seroconversion and abortion in cattle experimentally infected with *Brucella* sp. isolated from a Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*). *J Vet Diagn Invest*, 2001, **13**, 379-382.
- RICE, D.W. Sperm whale *Physeter macrocephalus* Linnaeus, 1758. In : edited by Ridgway, S.H. and Sir Harrison, R., *Handbook of marine mammals, volume 4: river dolphins and the larger toothed whales*. Academic Press : San Diego, 1989, p. 177-233.
- RIMA B.K., COSBY S.L., DUFFY N., LYONS C., O'LOAN D., KENNEDY S., MCCULLOUGH S.J., SMYTH J.A., MCNEILLY F. Humoral immune response in seals infected by phocine distemper virus. *Res Vet Sci*, 1990, **49**, 114-116.
- ROSS P.S., VISSER I.K.G., BROEDERS H.W.J., VAN DE BILDT M.W.G., BOWEN W.D., OSTERHAUS A.D.M.E. Antibodies to phocine distemper virus in Canadian seals. *Vet.Rec.*, 1992, **130**, 514-516.
- ROSS P.S., DESWART R.L., REIJNDERS P.J.H., VANLOVEREN H., VOS J.G., OSTERHAUS A.D.M.E. Contaminant-related suppression of delayed-type hypersensitivity and antibody responses in harbor seals fed herring from the Baltic Sea. *Environ Health Perspect*, 1995, **Vol 103, Iss 2**, 162-167.
- ROSS P.S., DESWART R.L., TIMMERMAN H.H., REIJNDERS P.J.H., VOS J.G., VANLOVEREN H., OSTERHAUS A.D.M.E. Suppression of natural killer cell activity in harbour seals (*Phoca vitulina*) fed Baltic Sea herring. *Aquatic Toxicology*, 1996, **Vol 34, Iss 1**, 71-84.
- ROSS P.S., VOS J.G., BIRNBAUM L.S., OSTERHAUS A.D.M.E. PCBs are a health risk for humans and wildlife. *Science*, 2000, **289**, 1878-1879.
- ROTE, N.S. Alterations in immunity and inflammation. In : edited by Mc Cance, K.L. and Huether, S.E., *Pathophysiology: the biologic basis for diseases in adults and children*. Mosby : St. Louis, 1994, p. 268-298.
- SCHULMAN F.Y., LIPSCOMB T.P., MOFFETT D., KRAFFT A., LICHY J.H., TSAI M.M., TAUBENBERGER J.K., KENNEDY S. Histologic, immunohistochemical, and polymerase chain reaction studies of Bottlenose dolphins from the 1987-1988 United States Atlantic coast epizootic. *Vet.Pathol.*, 1997, **34**, 288-295.

- SCHULMAN F.Y., LIPSCOMB T.P. Dermatitis with invasive ciliated protozoa in dolphins that died during the 1987-1988 Atlantic Bottlenose dolphin morbilliviral epizootic. *Vet.Pathol.*, 1999, **36**, 171-174.
- SCHUMACHER U., HORNY H.-P., HEIDEMANN G., SCHULTZ W., WELSCH U. Histopathological findings in harbour seals (*Phoca vitulina*) found dead on the German North Sea coast. *J.Comp.Path.*, 1990, **102**, 299-309.
- SIEBERT, U., BENKE, H., FREZE, K., PIRRO, F. and LICK, R.R. Postmortem examination of by-catches from German fisheries and suspected by-catches found on the coast of Germany. In : edited by Kuiken, T., *Diagnosis of by-catch in cetaceans: proceedings of the second European Cetacean Society workshop on cetacean pathology, Montpellier, France, 2 March 1994*. European Cetacean Society : Saskatoon, Saskatchewan, 1996, p. 27-30.
- SIEBERT U., JOIRIS C., HOLSBEEK L., BENKE H., FAILING K., FREZE K., PETZINGER E. Potential relation between mercury concentrations and necropsy findings in cetaceans from German waters of the North and Baltic Seas. *Mar.Pollut.Bull.*, 1999, **38**, 285-295.
- SIEBERT U., WÜNSCHMANN A., WEISS R., FRANK H., BENKE H., FRESE K. Post-mortem findings in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from the German North and Baltic Seas. *J.Comp.Path.*, 2001, **124**, 102-114.
- SIMMONDS, M.P. Cetacean mass mortalities and their potential relationship with pollution. In : edited by Symoens, J.J., *Whales: Biology-Threats-Conservation*. Royal Academy of Overseas Sciences : Bruxelles, 1992, p. 217-245.
- SMEENK C. Strandings of sperm whales *Physeter macrocephalus* in the North Sea: history and patterns. *Bull Inst Roy Sc Nat de Belgique*, 1997, **67-suppl.**, 15-28.(Abstract)
- SMEENK, C. A historical review. In : edited by Tougaard, S. and Kinze, C.C., *Sperm whale strandings in the North Sea : the event-the action-the aftermath*. Fisheries and Maritime Museum : Esbjerg, 1999, p. 6-9.
- STONE R. Canine virus blamed in Caspian seal deaths. *Science*, 2000, **289**, 2017-2018.
- STROUD R.K., ROFFE T.J. Causes of death in marine mammals stranded along the Oregon Coast. *J Wild Dis*, 1979, **15**, 91-97.
- STUEN S., HAVE P., OSTERHAUS A.D.M.E., ARNEMO J.M., MOUSTGAARD A. Serological investigation of virus infections in harp seals (*Phoca groenlandica*) and hooded seals (*Cystophora cristata*). *Vet.Rec.*, 1994, **134**, 502-503.
- SVANSSON V., BLIXENKRONE-MØLLER M., SKIRNISSON K., HAVE P., HEJE N.-I., NIELSEN J., LUND E. Infection studies with canine distemper virus in harbour seals. *Arch Virol*, 1993, **131**, 349-359.
- TAUBENBERGER J.K., TSAI M., KRAFFT A., LICHY J.H., REID H.A., SCHULMAN F.Y., LIPSCOMB T.P. Two morbilliviruses implicated in bottlenose dolphin epizootics. *Emerging Infectious Diseases*, 1996, **2**,
- TAUBENBERGER J.K., TSAI M., ATKIN J., FANNING T.G., KRAFFT A., MOELLER R.B., KODSI S.E., MENSE M.G., LIPSCOMB T.P. Molecular genetic evidence of a novel morbillivirus in a long-finned pilot whale (*Globicephalus melas*). *Emerging Infectious Diseases*, 2000, **6**, 42-45s.
- TAVERNIER J. Marine mammal strandings: technical control on site. *Bull Inst Roy Sc Nat de Belgique*, 1997, **67-suppl.**, 115-118.
- THOMPSON P.M., CORNWELL H.J.C., ROSS H.M., MILLER D. Serologic study of phocine distemper in a population of harbour seals in Scotland. *J Wild Dis*, 1992, **28**, 21-27.

- TITENKO A.M., BORISOVA T.I., BEIM A.M., NOVOZHILOV S.S., KUDELIN V.N., ZORIN V.L., KUMAREV V.P., KOLESNIK R.S. Experimental infection of seal (*Phoca sibirica*) with morbillivirus. *Vopr Virusol*, 1991, **36**, 511-512.
- TREGENZA N., BERROW S.D., HAMMOND P., LEAPER R. Common dolphin, *Delphinus delphis* L., bycatch in bottom set gill nets in the Celtic Sea. *Rep.Int.Whal.Comm.*, 1997, **47**, 835-839.
- TREGENZA N., COLLET A. Common dolphin *Delphinus delphis* in pelagic trawl and other fisheries in the North East Atlantic. *Rep.Int.Whal.Comm.*, 1998, **48**, 453-459.
- TREGENZA N.J.C., BERROW S.D., LEAPER R., HAMMOND P. Harbour porpoise *Phocoena phocoena* bycatch in set gillnets in the Celtic Sea. *ICES J Mar Sc*, 1997, **54**, 896-904.
- TRUDGETT A., LYONS C., WELSH M.J., DUFFY N., MCCULLOUGH S.J., MCNEILLY F. Analysis of a seal and a porpoise morbillivirus using monoclonal antibodies. *Vet.Rec.*, 1991, **128**, 61.
- TRYLAND M., KLEIVANE L., ALFREDSSON M., KJED M., ARNASON A., STUEN S., GODFROID J. Evidence of *Brucella* infection in marine mammals in the North Atlantic Ocean. *Vet.Rec.*, 1999, **144**, 588-592.
- TSUR I., YAKOBSON B., ELAD D., MOFFETT D., KENNEDY S. Morbillivirus infection in a bottlenose dolphin from the Mediterranean sea. *Europ J Vet Pathol*, 1997, **3**, 83-85.
- UCHIDA K., HORII Y., MURAKAMI N., YAMAGUCHI R., TATEYAMA S., MURANAKA M. Non-purulent meningoencephalomyelitis of a Pacific striped dolphin (*Lagenorhynchus obliquidens*). The first evidence of morbillivirus infection in a dolphin at the Pacific Ocean around Japan. *J.Vet.Med.Sci.*, 1999, **61**, 159-162.
- UYS C.J., BEST P.B. Pathology of lesions observed in whales flensed at Saldanha bay, South Africa. *J.Comp.Path.*, 1966, **76**, 407-412.
- VAN BRESSEM M.F., VISSER I.K.G., DE SWART R.L., ÖRVELL C., STANZANI L., ANDROUKAKI E., SIAKAVARA K., OSTERHAUS A.D.M.E. Dolphin morbillivirus in different parts of the Mediterranean sea. *Arch Virol*, 1993, **129**, 235-242.
- VAN BRESSEM M.F., VAN WAEREBEEK K., FLEMING M., BARRETT T. Serological evidence of morbillivirus infection in small cetaceans from the Southeast Pacific. *Vet.Microbiol.*, 1998, **59**, 89-98.
- VAN BRESSEM M.F., VAN WAEREBEEK K., RAGA J.A. A review of virus infections of cetaceans and the potential impact of morbilliviruses, poxviruses and papillomaviruses on host population dynamics. *Dis Aquat Org*, 1999, **38**, 53-65.
- VAN BRESSEM M.F., VAN WAEREBEEK K., JEPSON P.D., RAGA J.A., DUGNAN P.J., NIELSEN O., DI BENEDETTO A.P., SICILIANO S., RAMOS R., KANT W., PEDDEMORS V., KINOSHITA R.E., ROSS P.S., LOPEZ-FERNANDEZ A., EVANS K., CRESPO E., BARRETT T. An insight into the epidemiology of dolphin morbillivirus worldwide. *Vet.Microbiol.*, 2001, **81**, 287-304.
- VAN DE BILDT M.W.G., MARTINA B.E.E., VEDDER E.J., KOMNENOU A., SIDI B.A., JIDDOU A.B., BARHAM M.E.O., NIESTERS H.G.M., OSTERHAUS A.D.M.E. Identification of morbilliviruses of probable cetacean origin in carcasses of Mediterranean monk seals (*Monachus monachus*). *Vet.Rec.*, 2000, **146**, 691-694.
- VAN DE BILDT M.W.G., MARTINA B.E.E., SIDI B.A., OSTERHAUS A.D.M.E. Morbillivirus infection in a bottlenose dolphin and a Mediterranean monk seal from the atlantic coast of west Africa. *Vet.Rec.*, 2001, **148**, 210-211.

- VAN DER KAMP J.S. Pulmonary diseases in seals: a histopathological review. *Aquatic Mammals*, 1987, **13**, 122-124.
- VAN NIE C.J. Postmortem findings in stranded harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) in The Netherlands from 23rd March 1983 to 25th June 1986. *Aquatic Mammals*, 1989, **15**, 80-83.
- VINTHER, M. Incidental catch of harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) in the Danish North Sea gillnet fisheries : preliminary results. In : edited by Danish Environmental Protection Agency, , *Scientific symposium on the North Sea quality status report 1993*. Ministry of Environment and Energy, Danish Environmental Protection Agency : Copenhagen, 1996, p. 210-213.
- VINTHER M. Bycatches of harbour porpoises (*Phocoena phocoena* L.) in Danish set-net fisheries. *J.Cetacean Res.Manage.*, 1999, **1**, 123-135.
- VISSER I.K.G., KUMAREV V.P., ORVELL C., DE VRIES P., BROEDERS H.W.J., VAN DE BILDT M.W.G., GROEN J., TEPPEMA J.S., BURGER M.C., UYTDEHAAG F.G.C.M., OSTERHAUS A.D.M.E. Comparison of two morbilliviruses isolated from seals during outbreaks of distemper in North West Europe and Siberia. *Arch Virol*, 1990, **111**, 149-164.
- VISSER I.K.G., TEPPEMA J.S., OSTERHAUS A.D.M.E. Virus infections of seals and other pinnipeds. *Reviews in medical microbiology*, 1991, **2:2**, 105-114.
- VISSER I.K.G., VAN BRESSEM M.F., BARRETT T., OSTERHAUS A.D.M.E. Morbillivirus infections in aquatic mammals. *Vet Res*, 1993a, **24**, 169-178.
- VISSER I.K.G., VAN BRESSEM M.F., DE SWART R.L., VAN DE BILDT M.W.G., VOS H.W., VAN DER HEIJDEN R.W.J., SALIKI J.T., ÖRVELL C., KITCHING P., KUIKEN T., BARRETT T., OSTERHAUS A.D.M.E. Characterization of morbilliviruses isolated from dolphins and porpoises in Europe. *J Gen Virol*, 1993b, **74**, 631-641.
- VISSER I.K.G., VEDDER E.J., VOS H.W., VAN DE BILDT M.W.G., OSTERHAUS A.D.M.E. Continued presence of phocine distemper virus in the Dutch Wadden Sea seal population. *Vet.Rec.*, 1993c, **133**, 320-322.
- WELLS D.E., CAMPBELL L.A., ROSS H.M., THOMPSON P.M., LOCKYER C. Organochlorine residues in harbour porpoises and bottlenose dolphins stranded on the coast of Scotland, 1988-1991. *The Science of the Total Environment*, 1994, **151**, 77-99.
- WELLS D.E., MCKENZIE C., ROSS H.M. Patterns of organic contaminants in marine mammals with reference to sperm whale stranding. *Bull Inst Roy Sc Nat de Belgique*, 1997, **67-suppl.**, 91-103.
- WILCOCK, B.P. The eye and ear. In : edited by Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C. and Palmer, N., *Pathology of domestic animals*. Academic Press : San Diego, 1993, p. 441-529.
- WÜNSCHMANN A., SIEBERT U., FRESE K. Thymic cysts in harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) from the German North Sea, Baltic Sea, and waters of Greenland. *Vet.Pathol.*, 1999a, **36**, 391-396.
- WÜNSCHMANN A., SIEBERT U., WEISS R. Rhizopusmycosis in a harbor porpoise from the Baltic Sea. *J Wild Dis*, 1999b, **35**, 569-573.
- YAMATO, J.T., DONOHOE, R.M., FRY, M.D., GOLUB, M.S. and DONALD, J.M. Environmental estrogens: implications for reproduction in wildlife. In : edited by Fairbrother, A., Locke, L.N. and Hoff, G.L., *Noninfectious diseases of wildlife*. Iowa State University Press : Iowa, 1996, p. 31-51.

**10. PRESENTATION
SYSTEMATIQUE DES
ETUDES**

10.1. Etude 1 : Postmortem findings and causes of death of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded from 1990 to 2000 along the coastlines of Belgium and Northern France

JAUNIAUX T.¹, PETITJEAN D.¹, BRENEZ C.¹, BORRENS M.¹, BROSENS L.¹, HAELTERS J.², TAVERNIER J.³, COIGNOUL F.¹

1. Department of Pathology, Veterinary College, Sart Tilman Bat B43, University of Liege, 4000 Liege, Belgium

2. Management Unit of the North Sea Mathematical Models, Royal Belgian Institute of Natural Sciences, 3^e and 23^e Linieregimeentsplein, 8400 Oostende, Belgium

3. Royal Belgian Institute of Natural Sciences, Vautierstraat 29, 1000 Brussels, Belgium

Journal of Comparative Pathology, 2002, in press

Summary

Between the years 1990 and 2000, an attempt was made to determine the causes of death of 55 harbour porpoises stranded along the Belgian and northern French coasts. From 1990 to 1996, only five carcasses were collected as against seven in 1997, eight in 1998, 27 in 1999 and eight in 2000. The sex ratio was normal and most of the animals were juvenile. The most common findings were emaciation, severe parasitosis and pneumonia. A few cases of fishing net entanglement were observed. The main microscopical lesions were acute pneumonia, massive lung oedema, enteritis, hepatitis and gastritis. Encephalitis was observed in six cases. No evidence of morbillivirus infection was detected. Pneumonia was associated with bacteria or parasites, or both. The causes of death and the lesions were similar to those previously reported in other countries bordering the North Sea. The cause of the increased numbers of carcasses in 1999 were unclear but did not include viral epizootics or net entanglement. A temporary increase in the porpoise population in the southern North Sea may have been responsible.

Introduction

The multidisciplinary research group MARIN (Marine Animals Research and Intervention Network) deals with marine mammal strandings along the coasts of Belgium and Northern France (Fig. 1). Its aims are to identify the causes of death and monitor the health status of marine mammals. This work includes determining concentrations of chemical contaminants in tissues and relating lesions to toxicological data and human activities such as navigation and commercial fishing. Indeed, the North Sea is heavily exposed to contaminants such as heavy metals and organochlorines, which accumulate in predatory marine mammals (Siebert *et al.*, 1999).

Harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) are the most common cetaceans in the North Sea, being widely distributed across the northern and the central parts, but much less so in the southern part (Northridge *et al.*, 1995). In the southern part, the distribution follows a seasonal variation, porpoises being abundant in coastal waters during winter while in the summer they frequent the Dogger Bank (Reijnders *et al.*, 1996). During the 20th century, the porpoise population has severely declined along the coasts of the southern North Sea (Addink and Smeenk, 1999), probably due to pollution, entanglement in fishing gear and alterations in food supply.

The most frequent causes of death of North Sea porpoises are "by-catching" (accidental catching) in fishing gear and acute bronchopneumonia (Baker and Martin, 1992; Kuiken *et al.*,

1994; Kirkwood *et al.*, 1997). In the early 1990s, a few cases of morbillivirus infections were described (Kennedy *et al.*, 1991, 1992a). However, this disease has not been reported subsequently in the North Sea (Jepson *et al.*, 2000; Siebert *et al.*, 2001). Nevertheless, specific antibodies were detected in 10 % and 88 % of porpoises from British (van Bresseem *et al.*, 1998) and German waters (Müller *et al.*, 2000), respectively, indicating the persistence of morbillivirus infection in these populations (Müller *et al.*, 2000).

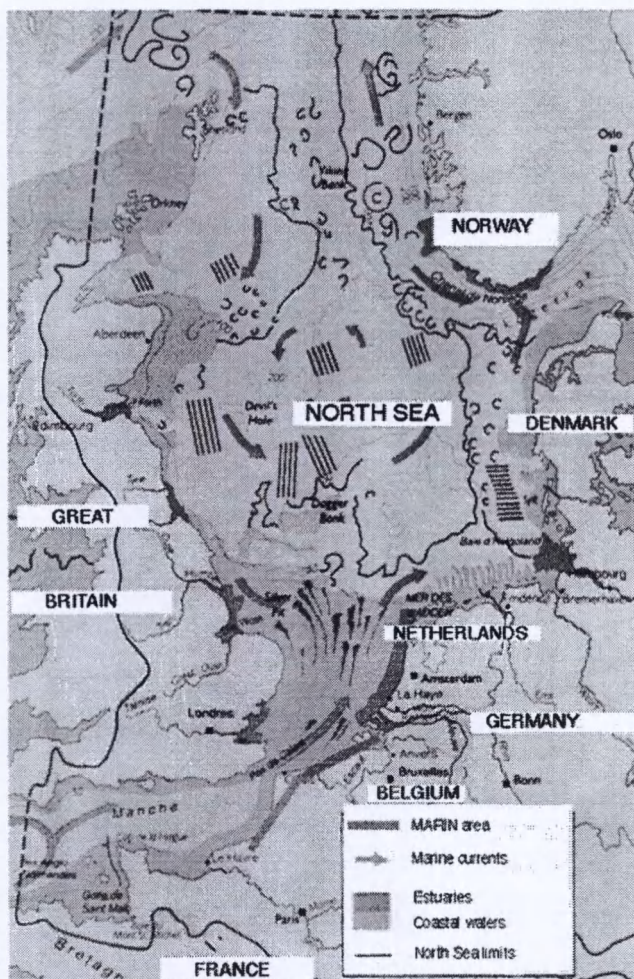


Figure 1: Coastline covered by the Marine Animals Research & Intervention Network in the southern North Sea, from the Scheldt estuary to the bay of the Somme.

The aims of this study were to describe the lesions and causes of death of harbour porpoises stranded along the Belgian and Northern France coastlines between 1990 and 2000, mainly after 1996.

Material and methods

Collection of Animals

Between 1990 and 2000, strenuous efforts were made to collect stranded or by-caught harbour porpoises along the Belgian coast. In addition, porpoises from the coast of northern France (from the Belgian border to the Bay of the Somme) were collected between 1995 and 2000. Carcasses were forwarded to the Department of Veterinary Pathology of the University of Liege. Three age categories based on body length were recognized: neonatal (≤ 90 cm), immature (91-130 cm) and mature (>130 cm) (Lockyer, 1995).

Necropsy and Samples

In total, 55 porpoises were subjected to necropsy and sampled by a standard procedure (Kuiken and García Hartmann, 1991). Briefly, the porpoises were measured and weighed, and the blubber thickness was measured at the caudal insertion of the dorsal fin. After external examination, the abdominal and thoracic cavities were opened and the skull was sown longitudinally to expose the brain.

For histopathology, samples of eye, skin, liver, lymph nodes, gonad, reproductive tract, oesophagus, stomach, intestine, kidney, urinary bladder, pancreas, lung, heart, thyroid, thymus and brain, and all tissues with lesions were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin wax by routine procedures. Sections (5 μm) were cut and stained with haematoxylin and eosin (HE). Selected sections were also stained with Masson trichrome, periodic acid Schiff (PAS) for fungi and Ziehl-Neelsen stain for acid-fast organisms. In addition, immunohistochemical examination with a monoclonal antibody against the glycosylated haemagglutinin protein of phocine distemper virus (clone 1.3) (Trudgett *et al.*, 1991; Domingo *et al.*, 1992) was performed on sections of lungs, pulmonary lymph nodes and all lesions suspected to have a viral origin. The other immunohistochemical reagents used were those included in the Enhanced Polymer One-Step Staining Procedure (Dako Envision™, Dako, Glostrup, Denmark) (Jauniaux *et al.*, 2000).

For bacteriology, tissue samples were collected aseptically and incubated under aerobic and anaerobic conditions on Columbia blood agar containing sheep blood 5 % (Becton Dickinson

Europe, Meylan Cedex, France) and on a selective medium for Enterobacteriaceae (Gassner agar, Oxoid, Gent, Belgium).

Blood samples were collected and examined for the presence of antibodies against *Brucella abortus* (Tryland *et al.*, 1999) and canine distemper virus (CDV) (Appel and Robson, 1973).

Parasites were collected and preserved in 70 % ethanol containing glycerin 5 %.

In suspected cases of viral disease, Vero cell cultures were infected as previously described for seals (Jauniaux *et al.*, 2001).

Results

Harbour Porpoises

The 55 carcasses examined consisted of 26 non-pregnant females, 28 males, and one animal of undetermined sex, obtained from the coasts of Belgium ($n=40$) and northern France ($n=15$). Six porpoises were neonatal, 30 immature, 17 mature, and two of undetermined age.

The annual distribution was irregular with a major rise in the final 4 years of the study, particularly in 1999 (Fig. 2). The majority of strandings occurred during winter and early spring.

Gross Pathology

The most common findings were severe emaciation (33/55), acute bronchopneumonia (27/55), and extended and multisystemic parasitosis (28/55). It was usual to find more than one possible cause of death in individual porpoises.

Body condition. Severe emaciation was characterized by weight loss, reduced blubber layer thickness and dorsal muscle atrophy. Mean blubber thickness for emaciated porpoises was 9.2 ± 3.8 mm and for non-emaciated porpoises 20.1 ± 10.7 mm ($P < 0.0001$). Blubber thickness was not associated with age or sex (data not shown).

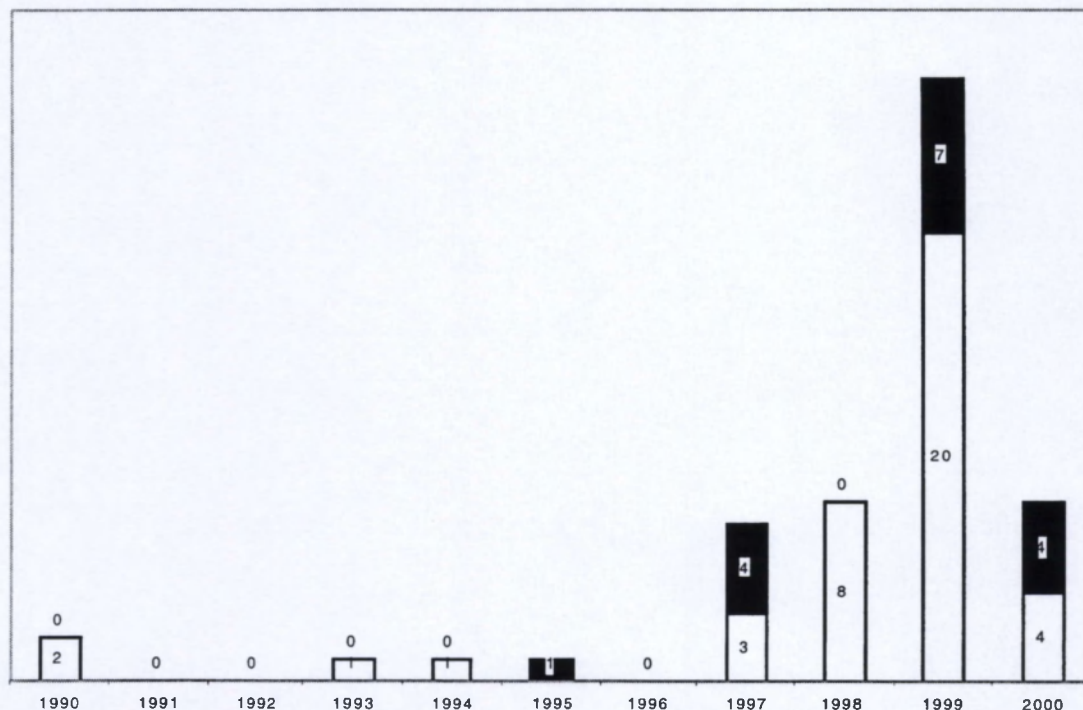


Figure 2: Annual distribution of porpoises found stranded along the coast of Belgium and northern France between 1990 to 2000. White column: Belgium coast; black column: northern France coast.

Bronchopneumonia and other intrathoracic findings. Acute bronchopneumonia was characterized by large areas of pulmonary consolidation with haemorrhagic or purulent fluid oozing from the parenchyma. In three cases, abscesses, 0.5 - 2 cm with creamy yellowish white contents were distributed throughout the lungs. Frothy fluid was frequently present in the bronchioli, bronchi and trachea, which also contained purulent, blood-stained exudate or small blood clots, or both. Most often, this finding was associated with massive infestation of the airways with the nematodes *Torynurus convolutus* and *Pseudalius inflexus*, the latter parasite being firmly attached to the lung parenchyma. Small airways were frequently partly or completely occluded. Pneumonia was associated with *Escherichia coli* ($n=2$), a non-haemolytic *Staphylococcus* sp. ($n=3$), a haemolytic *Streptococcus* sp. ($n=3$), *Aeromonas hydrophyla* ($n=1$) and *Proteus vulgaris* ($n=1$); all cases of *Pseudomonas* sp. infection ($n=4$) were associated with an acute necrotizing pneumonia. Parasitic infestation was also present in all of these cases of bacterial infection. The pulmonary and bronchial lymph nodes were often enlarged and oedematous. In one case, a chronic thrombus of a pulmonary collateral artery was observed. The wall of this vessel was thickened and the lumen occluded with an adherent thrombus which had organized around nematodes.

Of the six neonates, two were considered to be stillborn since the lungs were entirely atelectatic. Another was regarded as an aborted fetus since a section of umbilical cord, 82 cm in length, remained attached.

Acute pleurisy with fibrinopurulent exudate was observed on the surface of the left lung of one animal. It was associated with a fistula leading to a necrotic mass (5 cm in diameter) on the first rib, limited by a fibrous wall and containing bone fragments. The rib had recently been fractured, without evidence of bone repair. No lesion was observed in the overlying tissues.

Three porpoises had mild parasitic infestation of the pulmonary airways without evidence of bronchopneumonia.

Severe and extended parasitosis. This, the second most frequent observation, consisted of heavy infestations of multiple organs, with associated lesions of bronchopneumonia, chronic ulcerative gastritis and chronic hepatitis. Bronchopneumonia was associated with nematode infestations of airways and pulmonary blood vessels (*P. inflexus*), including pulmonary arteries and the right ventricle of the heart. In 12 cases, small nodules (3 to 6 mm in diameter) containing encapsulated nematodes, considered to be *Halocercus* sp., were disseminated throughout the lungs. A focal chronic pleuritis was associated with a nematode head embedded under the pleura, the body (13 cm length) lying free on the dorsal surface of the lung. Chronic ulcerative gastritis was frequently associated with nematode (*Anisakis simplex*) infestation (14 animals). The larvae of these worms were attached to the centre of the ulcers, while adults together with some larvae were free in the gastric lumen. Usually several hundred, and in one case > 1000, nematodes were present. The ulcers (1 to 3 cm in diameter) which had a punched-out appearance, were associated with thickened and congested submucosa. The surrounding epithelium was irregular, rough and hyperplastic and had a papillomatous appearance in severe cases (Fig. 3). Chronic nodules (1 to 2 cm in diameter) in the wall of the second stomach had a thick, white, fibrous capsule and a core containing trematodes (*Pholeter gastrophilus*). In one case, a trematode nodule at the junction of the second and third stomachs, had resulted in stenosis. Extensive chronic portal hepatitis associated with fibrosis of bile ducts was observed in some cases of severe liver trematode (*Campula oblonga*) infestation. White septa were apparent on the liver surface, and interstitial fibrosis and thickening of bile ducts were observed in the hepatic parenchyma. Flukes were observed in these damaged bile ducts and, in some cases, in the ductus choledochus. Frequently, spherical nodules (up to 3 cm in diameter) with a thick, fibrous, partly calcified wall, and dark green to black caseous contents were distributed throughout the liver. Similar nodules were also observed on the pancreas (one case) and on the abdominal surface of the diaphragm (one case). Adults and larvae of *Stenurus minor* were observed in the middle ear of 10 porpoises (out of 20 animals examined) but were

not associated with gross lesions. Intestinal tape worms, identified as *Diphyllobothrium* sp., were observed in four cases, without lesions.

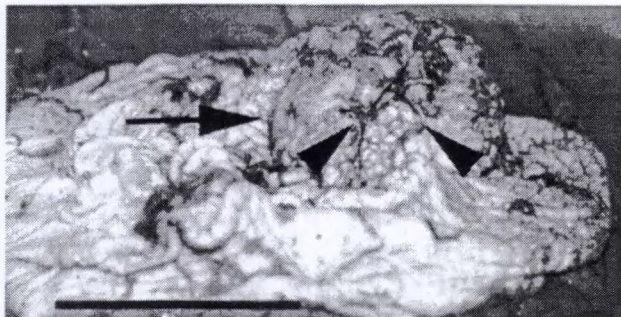


Figure 3: Nodular and hyperplastic (arrow) chronic ulcerative gastritis associated with *Ansisakis simplex* infestation (arrow head). Bar: 8 cm

By-catch. By-catch in fishing nets was considered to be the cause of death in eight porpoises. Of these, four were incontrovertible by-catches (one being trapped in a bottom set gill net), while the others were suspected of having been discarded after capture. All of these animals were in good nutritional condition, without evidence of severe disease. However, they all had extensive pulmonary congestion and oedema, abundant white, often blood-tinged froth within airways, subcutaneous haemorrhages and recent skin lacerations. One known by-catch was considered to have been trapped after death, as indicated by post-mortem skin lacerations, thin blubber (8 mm) and evidence of acute bronchopneumonia.

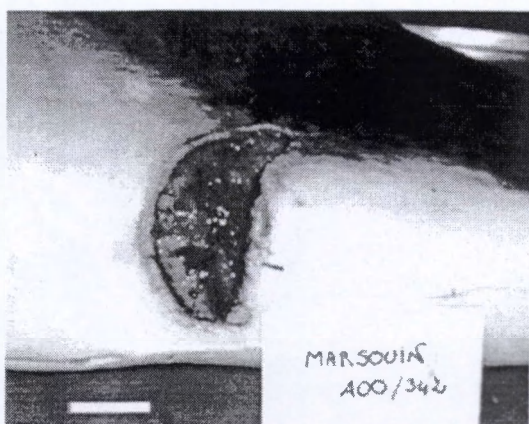


Figure 4: Large skin ulcer on the caudal peduncle extending into muscles. Bar : 8 cm

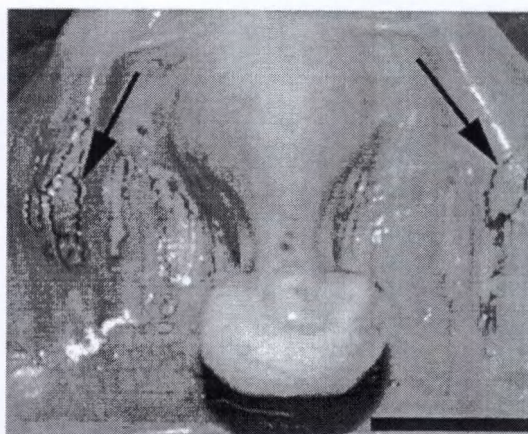


Figure 5: Dorsal view of larynx : acute ulcerative oesophagitis, ulcers (arrow) covered by fibrinous

Cutaneous findings. Cutaneous ulcers (0.5 to 4 cm in diameter) were observed in 12 porpoises, some being acute, covered by white necrotic membranes. Chronic ulcers had a thick irregular border and rough papillary centre. Two cases of severe skin ulceration were associated with a heavy infestation of copepods (*Isocyamus delphini*). In two animals, the ulcers were large and associated with a severe skin erosion (5 to 12 cm), extending down to the skeletal muscle (Fig. 4). One porpoise had numerous round pustules (2 to 3 cm in diameter) on the skin of the caudal peduncle, containing white, yellowish, creamy pus. White to grey spots (1 to 3.5 cm in diameter), limited by a grey to black border, were observed on the skin of the head or distributed over the body of six animals.

Gastro-intestinal findings. Acute to chronic ulcers, varying in size from 0.5 x 0.1 to 4 x 0.5 cm, were observed in the oesophagus of six porpoises. Five to 10 ulcers were usually present around the larynx or along the cranial third of the oesophagus (Fig. 5). Acute ulcers were frequently covered by white fibrinous membranes overlying a congested submucosa. In one case, hundreds of small longitudinal erosions and ulcers were distributed along the entire length of the esophagus. In three other porpoises, the oesophageal mucosa had hyperplastic foci characterized raised epithelial plaques, 3-5 mm diameter round. In one case, *Candida lipolytica* was isolated from acute perilaryngeal ulcers.

Acute ulcerative stomatitis was seen in six cases. Numerous round or elongated acute ulcers were present on the palate, tongue or gingiva, some being covered with a fibrinous membrane. A few palatine or gingival ulcers extended down to the submucosal connective tissue. Acute enteritis, diagnosed in five porpoises, was associated with hyperaemia of the serosal membrane and intraluminal haemorrhagic exudate.

In one case of severe acute peritonitis, 500 ml of fibrinohaemorrhagic exudate were present in the abdominal cavity and extensive fibrinous membranes adhered to the abdominal viscera. A small segment of the intestine and epiploon were dark red to black, suggesting an intestinal infarct. This lesion was considered to have resulted from intestinal volvulus.

The gastro-intestinal tract was empty, with no evidence of recent feeding, in 40 animals and contained fresh prey or otoliths in eight cases, the remaining seven not being examined. Some animals showed mild parasitic infestation of the gastric cavity (six cases), intestines (four cases) and bile ducts (two cases), without associated lesions.

Other findings. One porpoise showed signs of pyaemia, with small abscesses (1 to 2 mm in diameter) distributed throughout the liver, kidney and myocardium, while large abscesses were present in the lung in association with the chronic thrombus described above. *Streptococcus equisimilis* was isolated from the blood, brain and pulmonary lesions.

One adult female had a spherical (2 cm in diameter), white, homogeneous, hard mass protruding externally on the uterine cervix.

Both adrenal glands of an adult female (172 cm long), were hypertrophied and contained numerous spherical (2 to 10 mm in diameter) cysts with translucent, viscous contents. An adult male (160 cm long) had approximately 20 cysts on the thymus; these were yellowish, translucent and gelatinous, measuring 1 - 2 cm in diameter.

Histopathology

Respiratory lesions. In the lung, three major patterns of reaction were observed microscopically. Interstitial pneumonia was characterized by peribronchial lymphocytic infiltration and thickening of interalveolar septa by macrophages, lymphocytes and occasional eosinophils. In some cases, fibroplastic nodules with calcified cores were disseminated in the lung. Some bronchioles were occluded by concentric layers of hyaline membranes or by fibrous tissue entrapping eosinophils, lymphocytes and calcified areas. Frequently, an eosinophilic fluid containing macrophages filled the alveoli. Multinucleate giant cells were sometimes observed in the interstitial tissue or in the parenchyma around parasites. This first pattern of reaction was usually associated with adult nematodes in airways. The second type of reaction was a more acute lesion, characterized by neutrophilic infiltration in the parenchyma, and by exudation of fibrin, neutrophils, and erythrocytes into the airways. Haemorrhages, emphysema and atelectasis were frequently present. In severe cases, large areas of parenchymal necrosis were observed with loss of alveolar epithelium and only alveolar septa remaining visible. Bacteria were frequently observed within the areas of necrosis. Severe alveolar reaction was more frequently observed around nematode larvae (Fig. 6).

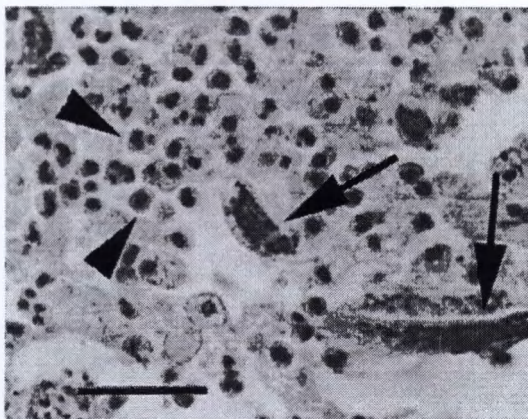


Figure 6: Acute bronchopneumonia with neutrophils infiltration (arrowhead) around nematode larvae (arrow). HE stain; Bar : 120 μ m

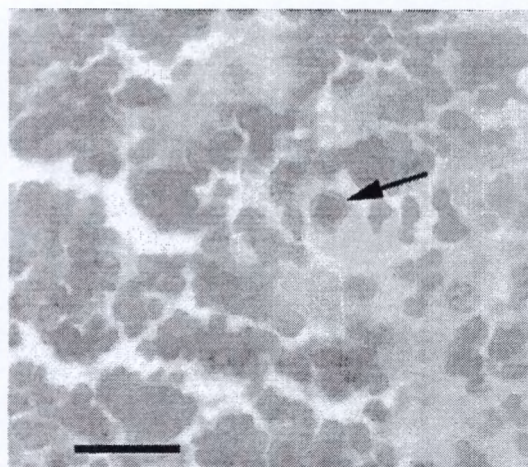


Figure 7: Intranuclear viral-like eosinophilic inclusion (arrow) in haemorrhagic area associated with subacute granulomatous encephalitis. Bar : 50 μ m

Sometimes, inflammatory exudation around nematode larvae resulted in occlusion of bronchial lumen and necrosis of bronchial wall. In two cases, large areas of necrosis were associated with vascular thrombosis. The third lesion pattern was associated with net entrapment. In these cases, the lung was severely congested, and oedematous fluid containing erythrocytes, was present in the parenchyma.

Muco-cutaneous lesions. Muco-cutaneous ulcers were usually subacute to chronic and were associated with infiltration of macrophages and fibroblasts into the underlying subcutis. A few eosinophils and evidence of neovascularization were frequently present. Areas of haemorrhage and necrosis were frequently observed in the subcutis with, in some cases, small thrombi in blood vessels. In the epithelium around the edges of ulcers, ballooning degeneration and intercellular oedema were observed, mainly in the stratum intermedium. Large intraepithelial vacuoles, with or without inflammatory cells (most frequently neutrophils), were observed near the surface. Mitotic figures were numerous in the stratum basale around ulcers. Some lingual ulcers extended to the muscle, resulting in mild myositis or muscle fibre degeneration. Few inflammatory cells were associated with oesophageal ulcers, and no evidence of inclusion bodies was observed. PAS staining was negative in all cases.

Hepatic and pancreatic lesions. The most common liver lesion was a chronic periangiocholangitis associated with fluke infestation. In severe cases, fibrosis was extensive and interlobular tissue was strikingly thickened, entrapping trematode eggs and sometimes lymphocytes. Frequently, in portal areas and in nodules, bile duct proliferation was visible. In two cases, subacute hepatitis was characterized by lymphocytic infiltration into small areas of parenchymal necrosis. Two animals had subacute pancreatitis with eosinophilic infiltration around pancreatic ducts, and ductal proliferation.

Gastro-intestinal lesions. Nodules and ulcers in the first stomach were most commonly associated with nematodes, while nodules in the wall of the second gastric compartment were due to fluke infestation. Subacute to chronic ulcers of the first gastric chamber were characterized by superficial submucosal necrosis with massive infiltration by macrophages, eosinophils, fibroblasts, and scattered lymphocytes. There was evidence of neovascularization in the submucosa. Nematodes were attached to the superficial layer of the submucosa, while dead parasites, frequently surrounded by a granulomatous reaction including giant cells, were observed in the deeper layers. The epithelium around ulcers was thickened and irregular, with severe intercellular oedema and acanthosis. The most frequent lesion in the wall of the second gastric cavity was a chronic nodular gastritis composed of successive layers of fibrous tissue in the submucosa, containing some lymphocytes and eosinophils and a core of trematodes and eggs.

Nervous and ocular lesions. Various inflammatory reactions were observed in the central nervous system of six porpoises. One case of severe subacute granulomatous encephalitis, affecting all the cerebral areas, was characterized by perivascular cuffs of macrophages and lymphocytes and large foci of haemorrhage. Areas of cerebral necrosis were massively infiltrated with macrophages. Virus-like eosinophilic intranuclear inclusion bodies (Fig. 7) were distributed throughout these lesions, but no virus was identified. A case of subacute meningoencephalitis was characterized by severe perivascular cuffs of macrophages and a few lymphocytes. A few trematode-like eggs with thick yellow, birefringent walls, were associated with this lesion. Three animals had a mild focal subacute encephalitis with local perivascular cuffing in the parietal or occipital cortex; in two of these cases, small necrotic foci were infiltrated by macrophages. Finally, an animal that died from pyaemia due to *Streptococcus equisimilis* had small abscesses distributed throughout the brain.

Perivascular cuffs of lymphocytes, plasmacytes and eosinophils were observed under the retina of two porpoises, and subretinal haemorrhage was observed in two animals with hyphaema.

Urogenital lesions. Mild to severe eosinophilic infiltration was observed in the thickened submucosa of the urinary bladder of nine porpoises.

The uterine mass (see above) in one adult female had the histological appearance of a fibroma and was composed of interlacing bundles of fibroblasts and collagen fibres, without evidence of mitotic figures.

Other lesions. Large cavitations seen in cystic adrenal glands were filled with an amorphous eosinophilic liquid.

Thymic cysts were limited by a simple squamous epithelium with intraluminal papillary projections. They had an acellular eosinophilic content. The adjacent thymic tissue was normal.

Neither immunohistochemistry nor cell culture revealed evidence of morbillivirus infection or other viral disease. Serology was negative for *Brucella abortus* in all porpoises tested.

Discussion

Severe emaciation, severe parasitism and bronchopneumonia were the commonest findings and fatal diseases observed were generally similar to those described in porpoises from other regions of the North Sea (Baker and Martin, 1992; Kirkwood *et al.*, 1997; Siebert *et al.*, 1999, 2001). However, entanglement in fishing nets was a rare cause of death in the present series, in contrast to some of the earlier studies. As reported by Siebert *et al.* (2001), determination of the cause of death is difficult in free-ranging wild animals, particularly cetaceans. They frequently become stranded when severely ill and several lesions, some potentially lethal, may be present simultaneously (Baker and Martin, 1992).

The blubber thickness of emaciated porpoises in this study was significantly thinner than in animals collected for necropsy by Lockyer (1995). On the German North Sea coast, most stranded or by-caught porpoises were in moderate or poor nutritional state whereas animals from the Baltic Sea were in good nutritional condition (Siebert *et al.*, 1999, 2001). Benke *et al.*

(1998) observed, however, that the body condition of stranded porpoises was inferior to that of by-caught animals. Siebert (1999) considered that poor nutritional status might be related to reduced food intake resulting from parasitic infection. Emaciation is not usually recorded as a fatal condition in immature or adult porpoises in British waters, starvation being described as a cause of death only in suckling animals separated from their mothers (Baker and Martin, 1992; Kirkwood *et al.*, 1997). Kirkwood *et al.* (1997) considered that starvation might be related to wear or loss of teeth in adults. In the present study, one emaciated adult had severely worn teeth and three neonates were severely emaciated with no evidence of milk or other food in the gastro-intestinal tract. The latter finding supports the view that separation from the mother may be cause of death. For the 29 remaining porpoises in poor nutritional status, emaciation compounded by other disorders, such as parasitosis and bronchopneumonia, was considered fatal. In addition, it is noteworthy that 70 % of the porpoises examined had an empty gastro-intestinal tract, indicating no recent food intake. It is usual for stranded cetaceans to have an empty alimentary tract (Kennedy *et al.*, 1991). It is possible that starvation was a consequence of ulceration of the upper gastro-intestinal tract. It might also have resulted from a decreased abundance of prey in the southern North Sea, including herring (*Clupea harengus*), sprat (*Sprattus sprattus*) and sandeel (*Ammodytes* sp.) (Addink and Smeenk, 1999). However, these species are still considered to be common in the area concerned.

Bronchopneumonia was frequently associated with parasitosis or emaciation, or both. These are chronic, debilitating processes which might predispose to fatal bronchopneumonia, lung parasitism, leading to secondary bacterial infection and bronchopneumonia. After entanglement in fishing nets, this combination has been identified as the most frequent cause of porpoises death in British (Baker and Martin, 1992; Jepson *et al.*, 2000), Dutch (García Hartmann, 1997) and German waters (Benke *et al.*, 1998; Siebert *et al.*, 1999, 2001). In the present study, acute bronchopneumonia was considered to be the cause of 49 % of deaths, which is similar to the 46% reported in German waters but higher than the 10 to 12% reported in British waters.

Heavy loads of parasites are often reported in porpoises without clinical disease (Read, 1999). Nevertheless, in our study, parasitism was severe, multisystemic and associated with macroscopical and microscopical lesions. Macroscopical evidence of parasitic infestation was found in the lungs of porpoises 96 cm or more in length. It is usual to find gross evidence of lungworm infestation in porpoises aged 7 to 10 months (>90 cm in length), suggesting that they are infected after weaning through the consumption of fish (van Nie, 1989; Jepson *et al.*, 2000), or in animals older than 1 year (Siebert *et al.*, 2001). However, infection via the placenta or milk is suspected for *Halocercus* sp. by Jepson *et al.* (2000). The airways being commonly infected by more than one parasite species and it was not possible to determine which is the most pathogenic (Jepson *et al.*, 2000). In our investigation, lesions of bronchopneumonia were more severe around larvae than around adults but no such difference

was observed by Jepson *et al.* (2000). Howard *et al.* (1983) reported an acute reaction around larvae of *Stenurus* sp. but minimal inflammation associated with adults. The prevalence of lungworm infestation, 56% in our investigations, is usually high in North Sea porpoises, reaching 60% for animals stranded on the Dutch (van Nie, 1989) and German coasts (Siebert *et al.*, 2001) and up to 69% for animals from British waters (Jepson *et al.*, 2000). High prevalence of lung-worms was also reported for by-caught animals. Disseminated abscesses associated with chronic thrombus observed in this study, is frequently reported with *Pseudalius inflexus* infections. Indeed, severe secondary bacterial or viral infection may develop in such cases, leading to abscessation or septicemia (Measures, 2001). Siebert *et al.* (2001) suggested that heavy parasitic infestation in the airways and pulmonary blood vessels reduce the ability to dive and hunt.

Anisakis simplex infestation of the first gastric compartment has frequently been associated with ulceration in stranded porpoises (Baker and Martin, 1992; Brattey and Stenson, 1995; Kirkwood *et al.*, 1997; Siebert *et al.*, 2001) and in other cetacean species (Sweeney and Ridgway, 1975; Baker, 1992; De Guise *et al.*, 1995). However, this association was less frequently observed in by-caught porpoises (Brattey and Stenson, 1995). The third stage larvae of this nematode are released into the host stomach from infected fish and burrow into the mucosa and submucosa of the gastric fundus, resulting in crater-like ulcer (Howard *et al.*, 1983). These ulcers usually have little pathological significance but may cause severe gastric haemorrhage (Kirkwood *et al.*, 1997) or serve as a portal of entry for pathogens (Wünschmann *et al.*, 1999b). The reported prevalence of *A. simplex* varies from 15 % (van Nie, 1989) to 43% (Baker and Martin, 1992), possibly due to variations in the abundance of intermediate hosts (Baker, 1992). In the present study, 14 porpoises were severely infested and six slightly.

The prevalence of infection of the middle ear by *Stenurus minor* in our investigation was similar to that reported previously in by-caught porpoises (Stroud and Roffe, 1979) and stranded (van Nie, 1989; Baker and Martin, 1992) porpoises. Stroud and Roffe (1979) found no pathological changes to be associated with this nematode, but it may interfere with navigation (Howard *et al.*, 1983) or provide a portal of entry for bacterial infection (García Hartmann, 1997). Although *S. minor* infestation in auditory organ was suspected to be involved in some cetaceans stranding, their role in such phenomenon remains unresolved (Measures, 2001).

Pyloric stenosis due to chronic gastritis associated with *Pholeter gastrophilus*, as observed in this study was regarded as the cause of death in a dolphin by Kirkwood *et al.* (1997). However, gastric nodules caused by trematodes, frequently observed in the stomach wall of cetaceans, are apparently of little pathological consequence (Baker, 1992; Baker and Martin, 1992; Siebert *et al.*, 2001).

As seen in this study, *Campula oblonga* infestation frequently produces local hepatic fibrosis and chronic cholangitis. It has a high prevalence in by-caught porpoises (Benke *et al.*, 1998).

Entanglement in fishing nets seemed a less important cause of death in our investigations than in studies from other countries bordering the North Sea (Baker and Martin, 1992; Kuiken *et al.*, 1994; Kirkwood *et al.*, 1997; Benke *et al.*, 1998; Siebert *et al.*, 2001). The annual average number of porpoises dying in Danish gill nets between 1994 and 1998 was 6785 (Vinther, 1999). The average percentage of stranded porpoises showing signs of net entanglement was 34% on the British coasts from 1990 to 1996 (Jepson *et al.*, 2000), 50% on the German coasts from 1991 to 1993 (Benke *et al.*, 1998), 10 - 20 % for the Dutch coast from 1990 to 1994 (Addink and Smeenk, 1999), and 24% for the French part of the Channel from 1970 to 1994 (A. Collet, unpublished data). In our study, only four porpoises were brought back by fishermen, but following Kuiken's (1996) criteria for death due to entanglement in fishing nets, we identified four additional by-caught porpoises. Such a level (8/55) was similar to that reported in the Netherlands. The difference between this study and those in other countries bordering the North Sea, where by-catch is considered to be the main threat for cetaceans, may be due to different fishery practices. Indeed, the use of gill nets is relatively infrequent in Belgium and the Netherlands (Reijnders *et al.*, 1996). Beyond the territorial limits, however, Dutch and Belgian waters are intensively used by gill net fishermen from other European nations, especially France, Denmark and the United Kingdom. The prevalence of by-catch, if based only on the number of porpoises reported by fishermen, would be largely underestimated in the southern North Sea. According to Siebert *et al.* (2001) by-catches probably have a significant impact on the population dynamics of North Sea porpoises.

One porpoise had a fractured rib with severe acute exudative pleurisy but without evidence of other lesions. Rib fractures in porpoises are consistent with attacks from bottlenose dolphins (Jepson and Baker, 1998) but this is usually accompanied by other traumatic lesions (Jepson *et al.*, 2000).

Upper digestive tract ulcers have been reported frequently in stranded porpoises (Baker and Martin, 1992; Kennedy *et al.*, 1992a, 1992b) and other cetaceans (Domingo *et al.*, 1992; De Guise *et al.*, 1995; Jauniaux *et al.*, 1998). A specific aetiology has not been identified for mouth or oesophageal ulcers and it has been suggested that such lesions could be related to debilitating disease (Sweeney and Ridgway, 1975). As PAS staining was negative in all cases examined in this study, isolation of *Candida* sp. from one oesophageal ulcer is likely to have represented post-mortem contamination. Domingo *et al.* (1992), who found such lesions in morbillivirus-infected dolphins, attributed them to secondary opportunistic agents or to calicivirus, herpesvirus or picornavirus infections. Oesophageal ulcers have also been reported in beluga whales (De Guise *et al.*, 1995) seropositive for herpesvirus. Antibodies to

herpesvirus were also detected, however, in sera of animals without lesions (Mikaelian *et al.*, 1999).

Macroscopically visible thymic cysts similar to those observed in an adult male in this study, have only been reported previously in seven harbour porpoises in which they may have arisen from degenerating Hassal's corpuscles or condensed epithelial reticulum (Wünschmann *et al.*, 1999a).

Adrenal hyperplasia, observed in one adult in this study, may be aetiologically related to xenobiotics in seals (Bergman and Olsson, 1985), but such a relationship has not been established for porpoises (Kuiken *et al.*, 1993).

Infectious diseases may be related to high tissue concentration of organochlorines (Jepson *et al.*, 1999) or mercury (Siebert *et al.*, 1999), frequently reported in porpoises from other parts of the North Sea. Nevertheless, such an association was not always confirmed (Kuiken *et al.*, 1994).

A surprising observation in the present study was a recent rise in strandings. Indeed, in 1999, more porpoises were available for examination than in the entire previous 9-year period. There was no evidence to suggest that a viral infection was the cause of the increased mortality. Moreover, the majority of carcasses showed no signs of net entanglement. However, the number of porpoises in the southern North Sea may have increased, as indicated by increased sightings at sea and a recent rise in strandings in the Channel, an area in which porpoises were previously rare (Van Canneyt, personal communication). It seems more likely that such an increase would have resulted from a distribution shift rather than a recent rise in the local sub-population, because the ratio of juveniles to adults in our series was not modified. As reported by Addink and Smeenk (1999), changes in the abundance of odontocetes in certain regions may be related to the abundance of prey.

The area covered by this study extended from the Scheldt estuary to the bay of the Somme (Fig. 1). This is no more than a small section (200 km) of the entire North Sea coastline. It represents, however, a narrow and shallow part of the North Sea, which possibly encourages the concentration of marine mammals as they circulate through the Channel, thereby increasing the numbers of drifting carcasses that come ashore.

Acknowledgments

The authors thank Centre de Recherche sur les Mammifères Marins (La Rochelle, France), the volunteers and the Céto-club who helped us to collect and necropsy porpoises. We

also acknowledge M. Domingo for providing tissues of a morbillivirus-infected dolphin, A. Trudgett for the monoclonal antibody to the phocine distemper virus, and A. Villers, M. Sarlet, M.P. Desmecht and F. Verdebout for technical assistance. This work was funded by the Belgian State - Prime Minister's Service, Office for Scientific, Technical and Cultural Affairs (MN/DD/51).

References

- Addink, M. and Smeenk, C. (1999). The harbour porpoise *Phocoena phocoena* in Dutch coastal waters: analysis of stranding records for the period 1920-1994. *Lutra*, **41**, 55-79.
- Appel, M. and Robson, D.S. (1973). A microneutralization test for canine distemper virus. *American Journal of Veterinary Research*, **34**, 1459-1463.
- Baker, J.R. (1992). Causes of mortality and parasites and incidental lesions in dolphins and whales from British waters. *Veterinary Record*, **130**, 569-572.
- Baker, J.R. and Martin, A.R. (1992). Causes of mortality and parasites and incidental lesions in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from British waters. *Veterinary Record*, **130**, 554-558.
- Benke, H., Siebert, U., Lick, R.R., Bandomir, B. and Weiss, R. (1998). The current status of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) in German waters. *Archives of Fisheries and Marine Research*, **46**, 97-123.
- Bergman, A. and Olsson, M. (1985). Pathology of Baltic grey seal and ringed seal females with special reference to adrenocortical hyperplasia: is environmental pollution the cause of a widely distributed disease syndrome? *Finnish Game Research*, **44**, 47-62.
- Bratney, J. and Stenson, G.B. (1995). Helminth parasites of the alimentary tract of the harbor porpoise, *Phocoena phocoena* (L.), from Newfoundland and Labrador. *Journal of the Helminthological Society of Washington*, **62**, 209-216.
- De Guise, S., Lagace, A., Beland, P., Girard, C. and Higgins, R. (1995). Non-neoplastic lesions in beluga whales (*Delphinapterus leucas*) and other marine mammals from the St Lawrence estuary. *Journal of Comparative Pathology*, **112**, 257-271.
- Domingo, M., Visa, J., Pumarola, M., Marco, A.J., Ferrer, L., Rabanal, R. and Kennedy, S. (1992). Pathologic and immunocytochemical studies of morbillivirus infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Veterinary Pathology*, **29**, 1-10.
- García Hartmann, M. (1997). Pathology of marine mammals. In: *Marine Mammals, Seabirds, and Pollution of Marine Systems*, T. Jauniaux, F. Coignoul, and J.-M. Bouquegneau Eds, Presses de la Faculté de Médecine Vétérinaire, Liège, pp. 117-149.
- Howard, E.B., Britt, J.O. and Matsumoto, G. (1983). Parasitic diseases. In: *Pathobiology of Marine Mammal Diseases*, E.B. Howard Ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 119-232.
- Jauniaux, T., Boseret, G., Desmecht, M., Haelters, J., Manteca, C., Tavernier, J., Van Gompel, J. and Coignoul, F. (2001). Distemper in common seals (*Phoca vitulina*) stranded on the coasts of Belgium and northern France during summer 1998. *Veterinary Record*, **148**, 587-591.

- Jauniaux, T., Brosens, L., Jacquinet, E., Lambrigts, D., Addink, M.J., Smeenk, C. and Coignoul, F. (1998). Postmortem investigations on winter stranded sperm whales from the coasts of Belgium and the Netherlands. *Journal of Wildlife Diseases*, **34**, 99-109.
- Jauniaux, T., Charlier, G., Desmecht, M., Haelters, J., Jacques, T., Losson, B., Van Gompel, J., Tavernier, J. and Coignoul, F. (2000). Pathological findings in two fin whales (*Balaenoptera physalus*) with evidence of morbillivirus infection. *Journal of Comparative Pathology*, **123**, 198-201.
- Jepson, P.D. and Baker, J.R. (1998). Bottlenosed dolphins (*Tursiops truncatus*) as a possible cause of acute traumatic injuries in porpoises (*Phocoena phocoena*). *Veterinary Record*, **143**, 614-615.
- Jepson, P.D., Baker, J.R., Kuiken, T., Simpson, V.R., Kennedy, S. and Bennett, P.M. (2000). Pulmonary pathology of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded in England and Wales between 1990 to 1996. *Veterinary Record*, **146**, 721-728.
- Jepson, P.D., Bennett, P.M., Allchin, C.R., Law, R.J., Kuiken, T., Baker, J.R., Rogan, E. and Kirkwood, J.K. (1999). Investigating potential associations between chronic exposure to polychlorinated biphenyls and infectious disease mortality in harbour porpoises from England and Wales. *Science of the Total Environment*, **243/244**, 339-348.
- Kennedy, S., Kuiken, T., Ross, H.M., McAliskey, M., Moffett, D., McNiven, C.M. and Carole, M. (1992a). Morbillivirus infection in two common porpoises (*Phocoena phocoena*) from the coasts of England and Scotland. *Veterinary Record*, **131**, 286-290.
- Kennedy, S., Lindstedt, I.J., McAliskey, M., McConnell, S. and McCullough, S.J. (1992b). Herpesviral encephalitis in a harbour porpoise (*Phocoena phocoena*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **23**, 374-379.
- Kennedy, S., Smyth, J.A., Cush, P.F., McAliskey, M., McCullough, S.J. and Rima, B.K. (1991). Histopathological and immunocytochemical studies of distemper in harbour porpoises. *Veterinary Pathology*, **28**, 1-7.
- Kirkwood, J.K., Bennett, P.M., Jepson, P.D., Kuiken, T., Simpson, V.R. and Baker, J.R. (1997). Entanglement in fishing gear and other causes of death in cetaceans stranded on the coasts of England and Wales. *Veterinary Record*, **141**, 94-98.
- Kuiken, T. (1996). Review of the criteria for the diagnosis of by-catch in cetaceans. In: Diagnosis of By-catch in Cetaceans: Proceedings of the second European Cetacean Society workshop on cetacean pathology, Montpellier, France, 2 March 1994. T. Kuiken Ed., European Cetacean Society, Saskatoon, 38
- Kuiken, T., Bennett, P.M., Allchin, C.R., Kirkwood, J.K., Baker, J.R., Lockyer, C., Walton, M.J. and Sheldrick, M.C. (1994). PCBs, cause of death and body condition in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from British waters. *Aquatic Toxicology*, **28**, 13-28.
- Kuiken, T. and García Hartmann, M. (1991). Proceedings of the first European Cetacean Society workshop on cetacean pathology: dissection techniques and tissue sampling. ECS Newsletter, No. 17, special issue,
- Kuiken, T., Höfle, U., Bennett, P.M., Allchin, C.R., Kirkwood, J.K., Baker, J.R., Appleby, E.C., Lockyer, C., Walton, M.J. and Sheldrick, M.C. (1993). Adrenocortical hyperplasia, disease, and chlorinated hydrocarbons in the harbour porpoise (*Phocoena phocoena*). *Marine Pollution Bulletin*, **26**, 440-446.
- Lockyer, C. (1995). Aspects of the morphology, body fat condition and biology of the harbour porpoise, *Phocoena phocoena*, in British waters. In: *Biology of the Phocoenids*, A. Bjorge and G.P. Donovan Eds, International Whaling Commission, Cambridge, pp. 199-209.

- Measures, L.N. (2001). Lungworms of marine mammals. In: *Parasitic Diseases of Wild Mammals*, W. Samuel, M. Pybus, and A. Koca Eds, Manson, London, pp. 279-300.
- Mikaelian, I., Tremblay, M.-P., Montpetit, C., Tessaro, S.V., Cho, H.J., House, C., Measures, L. and Martineau, D. (1999). Seroprevalence of selected viral infections in a population of beluga whales (*Delphinapterus leucas*) in Canada. *Veterinary Record*, **144**, 50-51.
- Müller, G., Siebert, U., Wünschmann, A., Artelt, A. and Baumgartner, W. (2000). Immunohistochemical and serological investigation of morbillivirus infection in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from the German Baltic and North Sea. *Veterinary Microbiology*, **75**, 17-25.
- Northridge, S.P., Tasker, M.L., Webb, A. and Williams, J.M. (1995). Distribution and relative abundance of harbour porpoises (*Phocoena phocoena* L.), white-beaked dolphins (*Lagenorhynchus albirostris* Gray), and minke whales (*Balaenoptera acutorostrata* Lacepède) around the British Isles. *International Council for the Exploration of the Sea Journal of Marine Science*, **52**, 55-66.
- Read, A.J. (1999). Harbour porpoise *Phocoena phocoena* (Linnaeus, 1758). In: *Handbook of Marine Mammals, Vol. 6, The Second Book of Dolphins and the Porpoises*, S.H. Ridgway and Sir R. Harrison Eds, Academic Press, San Diego, pp. 323-355.
- Reijnders, P.J.H., Leopold, M.F., Camphuysen, C.J., Heessen, H.J.L. and Kastelein, R.A. (1996). The status of the harbour porpoise, *Phocoena phocoena*, in Dutch waters and the state of related research in the Netherlands: an overview. *Report of the International Whaling Commission*, **46**, 607-611.
- Siebert, U., Joiris, C., Holsbeek, L., Benke, H., Failing, K., Freze, K. and Petzinger, E. (1999). Potential relation between mercury concentrations and necropsy findings in cetaceans from German waters of the North and Baltic Seas. *Marine Pollution Bulletin*, **38**, 285-295.
- Siebert, U., Wünschmann, A., Weiss, R., Frank, H., Benke, H. and Frese, K. (2001). Post-mortem findings in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from the German North and Baltic Seas. *Journal of Comparative Pathology*, **124**, 102-114.
- Stroud, R.K. and Roffe, T.J. (1979). Causes of death in marine mammals stranded along the Oregon Coast. *Journal of Wildlife Diseases*, **15**, 91-97.
- Sweeney, J.C. and Ridgway, S.H. (1975). Common diseases of small cetaceans. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **167**, 533-540.
- Trudgett, A., Lyons, C., Welsh, M.J., Duffy, N., McCullough, S.J. and McNeilly, F. (1991). Analysis of a seal and a porpoise morbillivirus using monoclonal antibodies. *Veterinary Record*, **128**, 61.
- Tryland, M., Kleivane, L., Alfredsson, M., Kjød, M., Arnason, A., Stuen, S. and Godfroid, J. (1999). Evidence of *Brucella* infection in marine mammals in the North Atlantic Ocean. *Veterinary Record*, **144**, 588-592.
- van Bresse, M.F., Jepson, P.D. and Barrett, T. (1998). Further insight on the epidemiology of cetacean morbillivirus in the Northeastern Atlantic. *Marine Mammal Science*, **14**, 605-613.
- van Nie, C.J. (1989). Postmortem findings in stranded harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) in The Netherlands from 23rd March 1983 to 25th June 1986. *Aquatic Mammals*, **15**, 80-83.
- Vinther, M. (1999). Bycatches of harbour porpoises (*Phocoena phocoena* L.) in Danish set-net fisheries. *Journal of Cetacean Research and Management*, **1**, 123-135.

Wünschmann, A., Siebert, U. and Frese, K. (1999a). Thymic cysts in harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) from the German North Sea, Baltic Sea, and waters of Greenland. *Veterinary Pathology*, **36**, 391-396.

Wünschmann, A., Siebert, U. and Weiss, R. (1999b). Rhizopusmycosis in a harbor porpoise from the Baltic Sea. *Journal of Wildlife Diseases*, **35**, 569-573.

10.2. Etude 2 : Morbillivirus in common seals stranded on the coasts of Belgium and northern France during summer 1998

T. JAUNIAUX, G. BOSERET, M. DESMECHT, J. HAELTERS, C. MANTECA, J. TAVERNIER, J. VAN GOMPEL, F. COIGNOUL

T. Jauniaux, DVM, G. Boseret, DVM, F. Coignoul, DVM, PhD, Department of Pathology, Veterinary College, Sart Tilman Bat B43, University of Liege, 4000 Liege, Belgium

M. Desmecht, DVM, Veterinary and Agrochemical Research Centre, Groeselenberg 99, 1180 Brussels, Belgium

J. Haelters, Management Unit of the North Sea Mathematical Models, Royal Belgian Institute of Natural Sciences, 3^e and 23^e Linieregimeentsplein, 8400 Oostende, Belgium

C. Manteca, DVM, Veterinary Centre for Prevention of Animal Diseases, Av. Deponthière 40, 4431 Loncin, Belgium

J. Tavernier, Royal Belgian Institute of Natural Sciences, Vautierstraat 29, 1000 Brussels, Belgium

J. Van Gompel, DVM, Koninginlaan, 40, 8370 Blankenberge, and National Sea Life Centre Blankenberge, Belgium

The Veterinary Record, **148**, 587-591, 2001

Summary

Unexpected strandings of 16 common seal (dead or moribund) pups (*Phoca vitulina*) occurred on the Belgian and northern French coasts during the summer of 1998. Eleven animals (10 pups and 1 adult) were necropsied and sampled for histopathological, immunohistochemical, serological, bacteriological, parasitological, virological and RT-PCR investigations. The main necropsy findings were severe emaciation, acute haemorrhagic enteritis, acute pneumonia, interstitial pulmonary emphysema and oedema, and chronic ulcerative stomatitis. Microscopic lung findings were acute to subacute pneumonia with interstitial oedema and emphysema. Severe lymphocytic depletion was observed in lymph nodes. Severe acute to subacute meningoencephalitis was observed in 1 animal. By immunohistochemistry, there was specific staining with 2 monoclonal antibodies directed against canine distemper virus and phocine distemper virus in occasional lymphocytes in spleen and lymph nodes of 3 seals. Anti-CDV neutralising antibodies were detected in sera from 6 animals. Some seals were positive by RT-PCR for the morbillivirus phosphoprotein gene. The lesions observed were consistent with those found in animals infected by a morbillivirus, and demonstrated that distemper has recently occurred in North Sea seals

Introduction

Morbillivirus outbreaks have been found to be responsible for the death of many thousands of marine mammals in various parts of the world. Among pinnipeds, affected populations were harbour seals (*Phoca vitulina*) and grey seals (*Halichoerus grypus*) from the North Sea and the north-western Atlantic (Kennedy and others 1989, Duignan and others 1993, 1995), Lake Baikal seals (*Phoca sibirica*) (Grachev and others 1989, Osterhaus and others 1989, Belykh and others 1997), and Caspian seals (*Phoca caspica*) (Forsyth and others 1998, Kennedy and others 2000). Among cetaceans, morbillivirus lesions were reported in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from the coast of Ireland (Kennedy and others 1988, 1991, 1992), bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the Atlantic coast of the United States (Lipscomb and others 1994, 1996, Krafft and others 1995), striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from the Mediterranean Sea (Domingo and others 1990, 1992, van Bresseem and others 1991, Duignan and others 1992) and Atlantic fin whales (*Balaenoptera physalus*) (Jauniaux and others 1998, 2000).

From April 1988 to the beginning of 1989, approximately 18,000 harbour seals died in Northwestern Europe (Kennedy, 1990). This epizootic began along the Danish coast and spread to the coasts of Sweden, the Netherlands, Norway, Germany, the United Kingdom and Ireland. The morbillivirus responsible for the harbour seal epizootic was identified as a canine distemper-like virus called phocine distemper virus (PDV). Since early 1989, no cases have been reported in the North Sea seals, but serological studies suggested that PDV infection had persisted in this area (Visser and others 1993).

Since 1989, a multidisciplinary research network now called MARIN (Marine Animals Research & Intervention Network) deals with the scientific research of marine mammals stranded along the Belgian and northern France coasts or caught as bycatch. It investigates the cause of death of marine mammals and performs toxicological analyses on collected samples. MARIN assists in marine mammal rescues, live stranded animals being transported to rehabilitation centers. The aim of this paper is to present post-mortem observations and the cause of seal deaths during an outbreak occurring along the Belgian and northern French coasts during the summer of 1998. The main necropsy findings were severe emaciation and pneumonia. Histopathological, immunohistochemical, serological and RT-PCR analyses on seal samples revealed a morbillivirus infection.

Material and methods

Animal collection and necropsy

An usually high number of dead (n=6) or moribund (n=10) harbour seals strandings occurred on the coast of Belgium and northern France between July 30 and August 28, 1998 (Table 1). Moribund animals were sent to two seal rehabilitation centres (National Sea Life Centre, Blankenberge, Belgium, Zeehonden-creche, Pieterburen, The Netherlands) where 5 died within 4 weeks.

In total, 11 animals were necropsied using a standard protocol (Geraci and Lounsbury, 1993). Samples for histology and immunohistochemistry were fixed in 10% buffered formalin and samples for virus isolation and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) were kept frozen (-80°C) until analyses. On fresh animals, lung, intestinal content, bone marrow and blood were aseptically collected for bacteriological examination. For parasitology, lung, intestinal content and liver were sampled. On decomposed animals, only a partial necropsy was performed without sampling for histology and microbiology.

Histopathology

Formalin-fixed tissues (spleen, lung, bronchial and mesenteric lymph nodes, brain, intestine, liver, kidney, urinary bladder, adrenal gland, stomach, gonads and any tissues with lesions) from fresh animals, were embedded in paraffin and 5 µm sections were stained with haematoxylin and eosin.

Immunochemistry

A direct immunofluorescence technique was applied to frozen lung and spleen samples using an anti-canine distemper virus (CDV) polyclonal antibody (VARC, Groeselenberg 99, 1180 Brussels, Belgium). Blood samples were collected and a virus neutralisation test with CDV (Appel and Robson, 1973), slightly modified for immunofluorescence, was carried out.

On lung, spleen, urinary bladder, brain, thymus, mesenteric and bronchial lymph nodes, and selected lesions samples fixed in formalin, an immunoperoxidase technique was applied using a mouse monoclonal antibody (Mab) directed against the fusion protein of CDV (clone 1C5; Biogenesis, England) and a Mab against the haemagglutinin of PDV (clone 1.3) (Kennedy and others 1989, Trudgett and others 1991). The other reagents were part of a commercial kit using the Enhanced Polymer One-Step Staining procedure (Dako Envision™, Dako, Denmark). Tissues from a healthy seal and morbillivirus infected cetaceans (striped dolphin and fin whale) were used as negative and positive controls, respectively. Test sections, on which the first layer antibody was omitted, served as negative controls.

Virus isolation

Tissues positive by immunofluorescence were pooled, and Vero cells were infected with a 10 percent tissue suspensions. Cell cultures were checked at regular intervals for the presence of cytopathogenic changes and at each cell passage (8 days), cell cultures were stained (Diff Quick). The supernatant was examined by negative staining, using a transmission electron microscope (TEM).

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

RNA was extracted from frozen tissues using TriPure™ Isolation Reagent (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) following the manufacture's instructions. On formalin-fixed, paraffin embedded tissues, extraction was done using Paraffin block RNA Isolation™ (Ambion, Austin, Texas, USA). Reverse transcriptase was performed with random hexamers for first strand synthesis. For polymerase chain reaction, primers were used with frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissues (Krafft and others 1995). They amplify the morbillivirus phosphoprotein gene, yielding a 78 base pair product (Krafft and others 1995). Reaction was done using the GeneAmp® RNA PCR kit (Perkin Elmer, Roche Molecular Systems, New Jersey, U.S.A.). The PCR product was analysed by gel electrophoresis with

4% agarose and ethidium bromide staining. A formalin-fixed, paraffin-embedded lymph node of a morbillivirus-infected fin whale was used as positive control material. A formalin-fixed, paraffin-embedded lung's sample of an unaffected animal was used as a negative control and RT-PCR for beta-actin was performed as a control for amplifiable RNA (Krafft and others 1995).

Results

Clinical signs

Clinical signs were recorded during the rehabilitation programme and included biphasic hyperthermia, emaciation, weakness, pneumonia with difficult breathing, oculonasal discharges, and gastroenteritis with vomiting and diarrhoea with in some cases melena. Other symptoms were stomatitis, arthritis, conjunctivitis, external otitis and keratitis. Seals did not react when approached and were force-fed because of inappetance. Suspicions arose that a virus infection was involved as the situation and syndromes resembled those of the 1988 distemper epizootic.

The peak of strandings occurred from August 7 to 15, 1998 when 11 seals stranded.

Necropsy

There were 10 pups and 1 adult distributed as 6 males and 5 females (Table 1). Animals dead during the rehabilitation programme were necropsied a few hours after death. Other animals were in various stages of preservation and 4 were only partially necropsied due to advanced decomposition.

Necropsy findings are listed in Table 2. The main findings were acute pneumonia and emaciation with reduction or absence of fat and muscles atrophy. Lungs failed to collapse and were congested with interstitial and subpleural emphysema. Frothy fluid, containing blood in some cases, was observed in the trachea, bronchi and bronchioles, and the lung parenchyma was wet when sliced. The respiratory tract mucosa was frequently congested. One animal had acute pleuritis with fibrinopurulent exudate in the thoracic cavity and numerous chronic lung abscesses.

Mucopurulent or haemorrhagic nasal discharge was observed in 3 seals.

In 3 animals, acute enteritis was observed with hemorrhagic intestinal content, and enlarged oedematous mesenteric lymph nodes. Acute keratitis was noted in 2 cases with congestion of periorbital tissue and corneal ulceration (1 seal); ulcerative stomatitis was

	Stranding date	Rehabilitation period (week)	Outcome	Sex	Length (cm)	Weight (kg)
Live-stranded	30/07/98	1	N	M	92	8
	09/08/98	4	N	F	93.5	12.5
	09/08/98	4	N	M	100	12.6
	13/08/98	1 day	N	F	90	10.5
	26/08/98	1	N	M	100	11.5
	30/07/98	16	R	M		13.5
	07/08/98	15	R	M		14.5
	08/08/98	15	R	M		15
	15/08/98	14	R	M		17
	26/08/98	13	R	F		13
Dead-stranded	12/08/98	-	N	F	93	8.2
	12/08/98	-	N	M	97	8.9
	14/08/98	-	N	F	92.5	9.1
	14/08/98	-	N	F	92	7.3
	14/08/98	-	N	M	?	?
	28/08/98	-	N	M	?	?

TABLE 1: Date of stranding, outcomes, sex and body length and weight of seals stranded along the Belgian and French coasts during summer of 1998. Outcome: N: necropsied; R: released. Sex: M: male; F: female

observed in 2 animals. In dead stranded seals, the gastrointestinal tract was always empty, without evidence of recent feeding. No respiratory or gastro-intestinal parasites were observed.

During rehabilitation, *Pseudomonas aeruginosa* was isolated from the case of external otitis. Haemolytic *Streptococcus* sp. (group antigen G) was isolated from the lung, the intestine, the eye and the bone marrow of 1 seal and *Escherichia coli* was isolated from blood, lung and bone marrow of 2 seals, findings being consistent with a bacteremia or septicaemia.

Histopathology

In 3 seals, microscopic lung findings were mild subacute broncho-interstitial pneumonia with interstitial oedema, congestion and infiltration by lymphocytes, macrophages and a few neutrophils (Fig 1). In 1 case, small areas of necrosis were observed, associated with colonies of rod-shaped bacteria. Numerous macrophages were present in the bronchiolar lumen associated with serofibrinous exudate. A severe acute necrotising bronchopneumonia (1 case), was characterised by filling of alveoli and bronchi with exudate containing neutrophils and large macrophages, and areas of parenchymal necrosis, mainly in a peribronchiolar pattern.

Meningeal congestion was frequently observed and was sometimes associated with mild diffuse lymphocytic and macrophage infiltration. Acute meningoencephalitis was observed in one animal. The pia mater was thickened by exudate of macrophages and occasional neutrophils and areas of neutrophilic infiltration and neuronal necrosis were disseminated throughout the cerebrum. Haemorrhagic foci were also disseminated in the cerebrum and cerebellum. Perivascular cuffs of macrophages and a few lymphocytes were also disseminated in cerebral tissue.

In lymphoid tissue (lymph nodes, spleen and thymus), the main findings were lymphoid depletion with an absence of lymphoid follicles, and numerous lymphocytes with pyknotic nuclei. Eosinophilic intranuclear inclusion bodies were occasionally observed. Multinucleated cells were observed in mesenteric lymph nodes of 2 seals, in 1 case associated with granulomas composed of an eosinophilic core of necrotic tissue surrounded by macrophages. Mononuclear cells and eosinophils were frequently observed in intestinal villi, and submucosal lymphoid follicles were depleted with lymphocytic necrosis and prominence of fibrous stroma. Liver, kidneys and adrenal glands were commonly congested. In 2 cases, a mild acute to subacute hepatitis was characterised by neutrophils and macrophage infiltration in liver parenchyma.

Two seals had a severe subacute to chronic stomatitis associated with a superficial necrosis of submucosal connective tissue. Deep submucosal tissue, under ulcers, was infiltrated with macrophages, lymphocytes and fibroblasts with vascular thrombi and evidence of neovascularisation. At ulcer edges, scarce neutrophils were observed within epidermal layers and occasional epithelial cells were vacuolated with small intracytoplasmic inclusions and chromatin margination.

Immunochemistry

The results of investigations for morbillivirus infection are listed in Table 2.

Heavy immunofluorescence was detected in lung and spleen tissues from 2 animals, using an anti-CDV polyclonal antibody. Anti-CDV neutralising antibodies were detected in sera of 6 animals, with titres varying from 1/8 to 1/128.

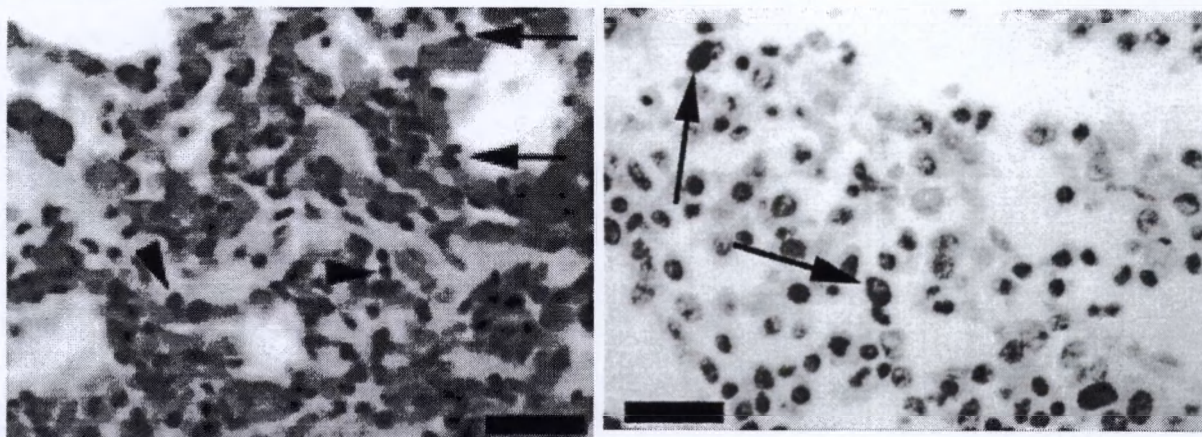


Figure 1: Broncho-interstitial pneumonia in a seal with morbilliviral infection. There were interstitial oedema, congestion and infiltration by mononuclear cells (arrow head) and a few neutrophils (arrow). Haematoxylin and eosin. Bar = 50 μ m.

Figure 2: Immunoperoxidase staining for morbillivirus in a lymph node of a seal with morbilliviral infection. There was seen a diffuse intracytoplasmic reaction (arrow) in mononuclear cells. Haematoxylin counterstain. Bar = 50 μ m.

By immunohistochemistry, there was specific labelling with PDV 1,3 Mab in lymphocytes of lymph nodes, spleen or thymus of 3 seals and with CDV 1C5 Mab in the spleen of 1 other seal. Immunoperoxidase labelling was seen as a diffuse intracytoplasmic reaction in mononuclear cells (Fig 2). Intranuclear labelling was observed in a lymph node of one animal.

Virus isolation

After 3 passages, syncytial cells were observed after DiffQuick staining and viral particles, typical of paramyxovirus, were observed by negative staining.

C.C.	Lesions	IF	SN	IC	RT-PCR	
					Frozen tissues	FFPE tissues
2	Emaciation, pneumonia, enteritis	+	1/8	+ : S	+ : L, S, LN	+ : LN
3	Emaciation, subpleural emphysema,	-	1/8	-	NP	NP
4	enteritis	-	1/8	-	+ : L	NP
3	Emaciation	-	NP	-	NP	NP
4	Emaciation	-	NP	-	NP	NP
2	Emaciation	-	NP	+ : LN	+ : L, S	-
2	Emaciation, pneumonia	+	1/128	+ : LN,	+ : L, S, LN	+ : B, LN
2	Emaciation, pleuro-pneumonia	-	1/16	T	+ : L, S	+ : B, LN
5	Emaciation, pneumonia, enteritis	NP	NP	+ : LN,S	NP	NP
4	Putrefaction	NP	NP	NP	+ : L, S	NP
2	Emaciation	NP	1/20	NP	+ : L	NP
	Emaciation			NP		

TABLE 2 : Results of post-mortem investigations on seals stranded along the coasts of Belgium and France during the summer of 1998. C.C.: condition code: 2: very fresh; 3: moderate decomposition, 4: advanced decomposition; NP: not performed; IF: immunofluorescence; SN: seroneutralisation; IC: immunochemistry; +: positive result, -: negative result, NP: non performed; FFPE: formalin fixed paraffin embedded; L: lung, S: spleen, LN: lymph node, B: brain, T: thymus.

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Fragments of the expected size of about 78 base pairs (Fig 3) were generated from various frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissues (Table 2). Positive results were obtained from 5 seals, including 2 animals moderately to severely decayed and 3 which were very well preserved. Fragments were similar to the positive control lymph node. RT-PCR was positive for beta-actin but negative for negative control.

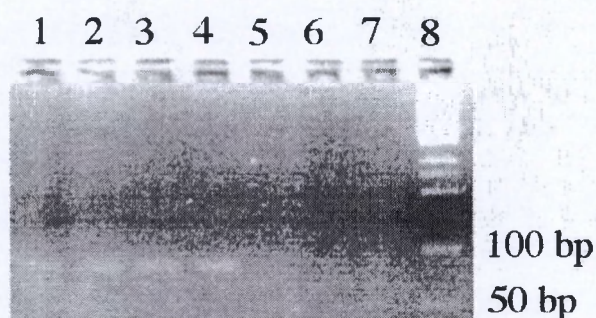


Figure 3: Lanes 1 and 2: positive control material; line 3 and 4 : specific 78 base pair (bp) product amplified from lung (lane 3) and lymph node (lane 4); lane 5, 6 and 7 : no amplification; lane 8 : 50 bp DNA ladder; 4% agarose gel and ethidium bromide staining.

Discussion

Evidence of a morbillivirus infection in seals stranded along the Belgian and northern France coasts during the summer of 1998 may be summarized as following : specific immunolabelling was demonstrated in lymphoid tissues of 4 animals; 6 seals had serological evidence of infection; typical viral particles were observed by TEM after cell culture; and finally, by RT-PCR, specific fragments were amplified from tissues of 7 seals. By immunohistochemistry and/or RT-PCR investigations, 7 seals were considered to be infected by a morbillivirus while no conclusion could be drawn on the 4 others. These findings suggest that a morbillivirus disease caused the seal strandings. To the authors' knowledge, this is the first report of morbillivirus disease in harbour seals since the 1988-1989 outbreak and they indicate that distemper is still present in the North Sea seal population.

Clinical signs, gross pathological, histological and immunohistological findings were similar to those reported in seal species with morbillivirus infection (Kennedy and others 1989, Bergman and others 1990, Krogsrud and others 1990, Nunoya and others 1990, Daoust and others 1993, Duignan and others 1993). This was confirmed by the isolation of paramyxovirus-like particles in cell culture and by positive RT-PCR results.

In our investigations some carcasses were putrefied, hampering morbillivirus diagnosis. Nevertheless, RT-PCR analyses revealed the infection in 2 decomposed seals, without other evidence of infection. Indeed, when tissue samples are unsuitable for histology and immunohistochemistry, only amplification of small RNA fragments is most appropriate for diagnosis (Krafft and others 1995).

Besides the diagnosis of morbillivirus confirmed so far, it would be necessary to further characterise the virus involved in order to compare it with other strains known to have previously affected seals. Further investigations, using RT-PCR amplification of larger viral RNA sequences of the phosphoprotein gene are in progress and will allow us such comparison (Barrett and others 1993; Taubenberger and others 2000).

Interstitial pneumonia has previously been reported in morbillivirus-infected seals (Kennedy and others 1989, Duignan and others 1993). No pulmonary syncytia with intranuclear inclusion bodies were observed in our samples but are not always reported (Krogsrud and others 1990, Heje and others 1991, Kennedy and others 2000). In addition, they are more frequently noted in cetaceans than in seal tissues (Domingo and others 1992, Kennedy, 1998). The multinucleated cells that we observed in lymph nodes were consistent with giant cells associated with parasitic larval migration and were not considered as virally induced syncytial cells. Severe lymphoid depletion suggests that the morbillivirus infection caused immunosuppression and secondary diseases such as the 3 cases of septicaemia observed in present study. The suppurative bronchopneumonia and encephalitis were also probably caused by secondary bacterial infection.

All seals were in poor body condition as indicated by the reduced amount or absence of subcutaneous or abdominal fat and atrophy of dorsal muscles. Such condition was reported on other morbillivirus infected seals (Forsyth and others 1998) or cetaceans (Duignan and others 1992, Kennedy and others 1992).

During 1998 summer, 11 died in less than 1 month while previously from 1990 to 1997, on the same area only 6 seals were found dead (Jauniaux T., unpublished data). With the exception of one animal, all were pups of around 8 weeks old. This age corresponds with the loss of passively acquired maternal PDV-neutralising antibodies, leading to increased susceptibility to PDV infection (Harder and others 1993). In addition, Visser and others (1993) reported that 6 pups died of phocine distemper within 2 weeks of birth while parents did not show any signs of infection, corresponding to our observations without disease in adults. Weaning at this age represents an additional predisposing factor.

Because juvenile seals become more susceptible to PDV infections after loss of passively acquired maternal immunity, Harder and others (1993) anticipated an increase in the number of PDV—susceptible seals in the North Sea for animals born after 1989. In addition, the majority of the seal population in the Dutch Wadden Sea had morbillivirus-specific antibodies and it was suspected that active PDV infections would continue to occur in that area (Visser and others 1993). Indeed, juvenile seals (three months to one year old) which have lost their maternal antibodies and were sampled in the Wadden Sea in 1992, had morbillivirus-specific antibodies. It is believed that morbillivirus infection can persist in small groups without evidence of disease

(Visser and others 1993). The present results support the hypothesis that PDV has continued to circulate in the North Sea since 1989.

Earlier observations of marked seals showed that most seals on Belgian coast originated from the east coast of England, especially from The Wash. In 1998, this was indirectly confirmed as an abnormally high mortality of seal pups occurred in The Wash during summer (Van Gompel, 1999). Unfortunately, it seems that the dead seals were not necropsied in that area.

As evidences suggest that morbillivirus infections circulate in the North Sea seal population as in many other marine mammals species around the world, monitoring programmes such MARIN should investigate the causes of pinniped and cetacean deaths as well as monitoring immune status of these species. Such analyses would be helpful to determining the susceptibility of marine mammal populations to specific diseases.

Acknowledgements

The authors thank A. Lastavel for collecting and providing animals

We also acknowledge M. Domingo for providing tissues of morbillivirus-infected dolphin, A. Trudgett for the monoclonal antibody to the phocine distemper virus, and A. Villers, M. Sarlet, M.P. Desmecht, and F. Verdebout for technical assistance. The authors are very grateful to E. Thiry for stimulating discussion and useful comments of the manuscript. This work was funded by the Belgian State - Prime Minister's Service, Office for Scientific, Technical and Cultural Affairs (MN/DD/51).

References

- APPEL M. & ROBSON D.S. (1973) A microneutralization test for canine distemper virus. *American Journal of Veterinary Research*, **34**, 1459-1463
- BARRETT T., VISSER I.K.G., MAMAIEV L., GOATLEY L., VAN BRESSEM M.F. & OSTERHAUS A.D.M.E. (1993) Dolphin and porpoise morbilliviruses are genetically distinct from phocine distemper virus. *virology new york*, **193**;2, 1010-1021
- BELYKH O., GOLDBERG O., LIKHOSHWAY Y. & GRACHEV M. (1997) Light, electron and immunoelectron microscopy of organs from seals of Lake Baikal sampled during the morbillivirus infection of 1987-1988. *European Journal of Veterinary Pathology*, **3**, 133-145
- BERGMAN A., JARPLID B. & SVENSSON B.M. (1990) Pathological findings indicative of distemper in European seals. *Veterinary Microbiology*, **23**, 331-341
- DAOUST P-Y, HAINES D.M., THORSEN J., DUIGNAN P.J. & GERACI J.R. (1993) Phocine distemper in a harp seal (*Phoca groenlandica*) from the gulf of St. Lawrence, Canada. *Journal of Wildlife Diseases*, **29**, 114-117
- DOMINGO M., FERRER L., PUMAROLA M., MARCO A.J., PLANA J., KENNEDY S., MCALISKEY M. & RIMA B.K. (1990) Morbillivirus in dolphins. *Nature*, **348**, 21

- DOMINGO M., VISA J., PUMAROLA M., MARCO A.J., FERRER L., RABANAL R. & KENNEDY S. (1992) Pathologic and immunocytochemical studies of morbillivirus infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Veterinary Pathology*, **29**, 1-10
- DUIGNAN P.J., GERACI J.R., RAGA J.A. & CALZADA N. (1992) Pathology of morbillivirus infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from Valencia and Murcia, Spain. *Canadian Journal of Veterinary Research*, **56**, 242-248
- DUIGNAN P.J., SADOVE S., SALIKI J.T. & GERACI J.R. (1993) Phocine distemper in harbour seals (*Phoca vitulina*) from Long Island, New York. *Journal of Wildlife Diseases*, **29**, 465-469
- DUIGNAN P.J., SALIKI J.T., ST.AUBIN D.J., EARLY G., SADOVE S., HOUSE J.A., KOVACS K. & GERACI J.R. (1995) Epizootiology of morbillivirus infection in North American harbor seals (*Phoca vitulina*) and gray seals (*Halichoerus grypus*). *Journal of Wildlife Diseases*, **31**, 491-501
- FORSYTH M.A., KENNEDY S., WILSON S., EYBATOV T. & BARRETT T. (1998) Canine distemper virus in a Caspian seal. *Veterinary Record*, **143**, 662-664
- GERACI J.R., LOUNSBURY V.J. (1993) Marine mammals ashore : a field guide for strandings. Galveston, Texas A&M sea grant publication. pp 133-143
- GRACHEV M., KUMAREV V.P., MAMAEV L.V., ZORIN V.L., BARANOVA L.V., DENIKINA N.N., BELIKOV S.I., PETROV E.A., KOLESNIK V.S., KOLESNIK R.S., DOROFEEV V.M., BEIM A.M., KUDELIN V.N., NAGEIVA F.G. & SIDOROV V.N. (1989) Distemper virus in Baikal seals. *Nature*, **338**, 209
- HARDER T.C., STEDE M., WILLHAUS T., SCHWARZ J., HEIDEMANN G. & LIESS B. (1993) Morbillivirus antibodies of maternal origin in harbour seal pups (*Phoca vitulina*). *Veterinary Record*, **132:25**, 632-633
- HEJE N.-I., HENRIKSEN P. & AALBOEK B. (1991) The seal death in Danish waters 1988 I. Pathological and bacteriological studies. *Acta veterinaria scandinavia*, **32**, 205-210
- JAUNIAUX T., CHARLIER G., DESMECHT M. & COIGNOUL F. (1998) Lesions of morbillivirus infection in a fin whale (*Balaenoptera physalus*) stranded along the Belgian coast. *Veterinary Record*, **143**, 423-424
- JAUNIAUX T., CHARLIER G., DESMECHT M., HAELTERS J., JACQUES T., LOSSON B., VAN GOMPEL J., TAVERNIER J. & COIGNOUL F. (2000) Pathological findings in two fin whales (*Balaenoptera physalus*) with evidence of morbillivirus infection. *Journal of Comparative Pathology*, **123**, 198-201
- KENNEDY S., SMYTH J.A., CUSH P.F., MCCULLOUGH S.J., ALLAN G.M. & MCQUAID S. (1988) Viral distemper now found in porpoises. *Nature*, **336**, 21
- KENNEDY S., SMYTH J.A., CUSH P.F., DUIGNAN P.J., PLATTEN M., MCCULLOUGH S.J. & ALLAN G.M. (1989) Histopathologic and immunocytochemical studies of distemper in seals. *Veterinary Pathology*, **26**, 97-103
- KENNEDY S. (1990) A review of the 1988 European seal morbillivirus epizootic. *Veterinary Record*, **127**, 563-567
- KENNEDY S., SMYTH J.A., CUSH P.F., MCALISKEY M., MCCULLOUGH S.J. & RIMA B.K. (1991) Histopathological and immunocytochemical studies of distemper in harbour porpoises. *Veterinary Pathology*, **28**, 1-7

- KENNEDY S., KUIKEN T., ROSS H.M., MCALISKEY M., MOFFETT D., MCNIVEN C.M. & CAROLE M. (1992) Morbillivirus infection in two common porpoises (*Phocoena phocoena*) from the coasts of England and Scotland. *Veterinary Record*, **131**, 286-290
- KENNEDY S. (1998) Morbillivirus infections in aquatic mammals. *Journal of Comparative Pathology*, **119**, 201-225
- KENNEDY S., KUIKEN T., JEPSON P.D., DEAVILLE R.C., FORSYTH M.A., BARRETT T., VAN DE BILDT M.W.G., OSTERHAUS A.D.M.E., EYBATOV T., DUCK A., KYDYRMANOV A., MITROFANOV I. & WILSON S. (2000) Mass die-off of Caspian seals caused by canine distemper virus. *Emerging Infectious Diseases*, **6**, 637-639
- KRAFFT A., LICHY J.H., LIPSCOMB T.P., KLAUNBERG B.A., KENNEDY S. & TAUBENBERGER J.K. (1995) Postmortem diagnosis of morbillivirus infection in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Atlantic and Gulf of Mexico epizootics by polymerase chain reaction-based assay. *Journal of Wildlife Diseases*, **31**, 410-415
- KROGSRUD J., EVENSEN O., HOLT G., HOIE S. & MARKUSSEN N.H. (1990) Seal distemper in Norway in 1988 and 1989. *Veterinary Record*, **126**, 460-461
- LIPSCOMB T.P., SCHULMAN F.Y., MOFFETT D. & KENNEDY S. (1994) Morbilliviral disease in Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the 1987-1988 epizootic. *Journal of Wildlife Diseases*, **30**, 567-571
- LIPSCOMB T.P., KENNEDY S., MOFFETT D., KRAFFT A., KLAUNBERG B.A., LICHY J.H., REGAN G.T., WORTHY G.A.J. & TAUBENBERGER J.K. (1996) Morbilliviral epizootic in bottlenose dolphins of the gulf of Mexico. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **8**, 283-290
- NUNOYA T., TAJIMA M., ISHIKAWA Y., SAMEJIMA T., ISHIKAWA H. & HASEGAWA K. (1990) Occurrence of a canine distemper-like disease in aquarium seals. *Japanese journal of veterinary science*, **52**, 469-477
- OSTERHAUS A.D.M.E., GROEN J., UYTDEHAAG F.G.C.M., VISSER I.K.G., V.D.BILDT M.W.G., BERGMAN A. & KLINGEBORN B. (1989) Distemper virus in Baikal seals. *Nature*, **339**, 209-210
- TAUBENBERGER J.K., TSAI M., ATKIN J., FANNING T.G., KRAFFT A., MOELLER R.B., KODSI S.E., MENSE M.G. & LIPSCOMB T.P. (2000) Molecular genetic evidence of a novel morbillivirus in a long-finned pilot whale (*Globicephalus melas*). *Emerging Infectious Diseases*, **6**, 42-45
- TRUDGETT A., LYONS C., WELSH M.J., DUFFY N., MCCULLOUGH S.J. & MCNEILLY F. (1991) Analysis of a seal and a porpoise morbillivirus using monoclonal antibodies. *Veterinary Record*, **128**, 61
- VAN BRESSEM M.F., VISSER I.K.G., VAN DE BILDT M.W.G., TEPEMA J.S., RAGA J.A. & OSTERHAUS A.D.M.E. (1991) Morbillivirus infection in Mediterranean striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Veterinary Record*, **129**, 471-472
- VAN GOMPEL J. (1999) Zeehondenvirus aan de Belgische kust in 1998. *Zoogdier*, **10**, 16-18
- VISSER I.K.G., VEDDER E.J., VOS H.W., VAN DE BILDT M.W.G. & OSTERHAUS A.D.M.E. (1993) Continued presence of phocine distemper virus in the Dutch Wadden Sea seal population. *Veterinary Record*, **133**, 320-322

10.3. Etude 3 : Lesions and causes of death of seals stranded on the coasts of Belgium and northern France from 1990 to 2000

T. JAUNIAUX¹, G. BOSERET¹, C. BRENEZ¹, J. HAELTERS², J. TAVERNIER³, F. COIGNOUL¹

1 Department of Pathology, Veterinary College, Sart Tilman Bat B43, University of Liege, 4000 Liege, Belgium

2 Management Unit of the North Sea Mathematical Models, Royal Belgian Institute of Natural Sciences, 3^e and 23^e Linierregimentsplein, 8400 Oostende, Belgium

3 Royal Belgian Institute of Natural Sciences, Vautierstraat 29, 1000 Brussels, Belgium

Journal of Comparative Pathology, submitted

Abstract

Since 1990, the multidisciplinary research network MARIN (Marine Animals Research & Intervention Network) deals with the scientific research of marine mammals stranded or by-caught along the Belgian and northern French coasts. Causes of death are investigated and toxicological analyses performed on collected samples. MARIN also assists in marine mammal rescues and transportation of live stranded animals to rehabilitation centres.

A total of 34 harbour seals (*Phoca vitulina*), 3 grey seals (*Halichoerus grypus*) and 1 hooded seal (*Cystophora cristata*) were necropsied. From 1990 to 1997, only 6 animals were available for post-mortem examination, against 10 in 1998, 8 in 1999 and 14 in 2000. Sex ratios were normal and animals were mainly juvenile (75%). The major non-human associated causes of death were bronchopneumonia and septicaemia. In addition, some seals showed evidence of a previous by-catch and various traumas. Evidence of morbillivirus infections was detected by immunochemistry (6 cases) and by Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (12 cases). Most of the infected seals were pups stranded August 1998. These findings suggest that a morbillivirus disease caused the strandings. To the authors' knowledge, those were first cases of morbillivirus infection in harbour seals in the North Sea since the 1988-1989 outbreak. They indicate that distemper is still present in the seal population. Bronchopneumonia and septicaemia were probably caused by secondary bacterial infections due to immunosuppression induced by the morbillivirus or by the lack of passive acquired immunity in 2 month-old animals.

Introduction

Before epizootic of seal distemper in 1988, few papers were published concerning lesions and causes of death of stranded seals, some being associated with herpesvirus or influenza infections (for review (Kennedy-Stoskopf, 2001)). At the end of the 1980s, many papers were published on seals distemper. Indeed, morbillivirus outbreaks have been found to be responsible for the death of many thousands of pinnipeds, including harbour seals (*Phoca vitulina*) and grey seals (*Halichoerus grypus*) from the North Sea and the north-western Atlantic (Kennedy *et al.*, 1989; Duignan *et al.*, 1993; Duignan *et al.*, 1995), Lake Baikal seals (*Phoca sibirica*) (Belykh *et al.*, 1997; Grachev *et al.*, 1989; Osterhaus *et al.*, 1989). Recently, epizootic appeared in Caspian seals (*Phoca caspica*) (Forsyth *et al.*, 1998; Kennedy *et al.*, 2000). From April 1988 to the beginning of 1989, approximately 18,000 harbour seals died in northwestern Europe (Kennedy, 1990). This epizootic began along the Danish coast and spread to the coasts of Sweden, the Netherlands, Norway, Germany, the United Kingdom and Ireland. The morbillivirus responsible for the harbour seal epizootic was identified as a canine distemper-like

virus called phocine distemper virus (PDV). Between 1990 and 1998, no cases have been reported in North Sea seals, but serological studies suggested that PDV infection had persisted in this area (Visser *et al.*, 1993). However, during the summer of 1998, distemper was diagnosed on 7 juveniles seals stranded on the Belgian and northern French coasts (Jauniaux *et al.*, 2001).

Since 1990, the multidisciplinary research network *MARIN* (Marine Animals Research & Intervention Network) deals with the scientific research of marine mammals stranded along the Belgian and northern France coasts. It investigates the cause of death of marine mammals and performs toxicological analyses on collected samples. The aim of this paper is to report on post-mortem observations and the cause of deaths of seals stranded along the Belgian and northern French coasts from 1990 to 2000.

Material and methods

Animal collection and necropsy

Since 1990, dead (stranded or by caught) seals were collected along the Belgian coast. In addition, animals from Northern France (from Belgian border to bay of the Somme) were included in your investigations in 1995 as well as some seals from the Dutch Scheldt estuary. Carcasses were transported to the Department of Veterinary Pathology of the University of Liege while sick animals were taken to two seal rehabilitation centres (National Sea Life, Blankenberge, Belgium, Zeehonden-crèche, Pieterburen, The Netherlands).

In total, 38 animals, including 34 harbour seals (*Phoca vitulina*), 3 grey seals (*Halichoerus grypus*) and 1 hooded seal (*Cystophora cristata*), were necropsied using a standard protocol (Geraci and Lounsbury, 1993). Briefly, seals were measured, weighted and blubber thickness was measured dorsally. The necropsy included external and internal examinations. Abdominal and thoracic cavities were opened and the skull was longitudinally sawed for central nervous system observation. Samples for histology and immunohistochemistry were fixed in 10% buffered formalin and samples for virus isolation and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) were kept frozen (-80°C) until analyses. Parasites were preserved in 70 % ethanol with 5 % glycerine. From fresh animals, lung, intestinal content, bone marrow and blood were aseptically collected for bacteriological examination. On decomposed animals, only a partial necropsy was performed without sampling for histology and microbiology.

Histopathology

Formalin-fixed tissues (spleen, lung, bronchial and mesenteric lymph nodes, brain, intestine, liver, kidney, urinary bladder, adrenal gland, stomach, gonads and any tissues with lesions) from fresh animals, were embedded in paraffin and 5 µm sections were stained with haematoxylin and eosin. On selected tissues, sections were also stained with Von Giesson, Periodic Acid Shift (PAS) and Ziehl-Neelsen.

Detection of morbillivirus

A direct immunofluorescence technique was applied to frozen lung and spleen samples using an anti-canine distemper virus (CDV) polyclonal antibody (VARC, Groeselenberg 99, 1180 Brussels, Belgium).

On selected samples (lung, spleen, urinary bladder, brain, thymus, mesenteric and bronchial lymph nodes) and lesions fixed in formalin, an immunoperoxidase technique was applied using a mouse monoclonal antibody (Mab) against the haemagglutinin of PDV (clone 1.3) (Trudgett *et al.*, 1991; Kennedy *et al.*, 1989). The other reagents were part of a commercial kit using the Enhanced Polymer One-Step Staining procedure (Dako Envision™, Dako, Denmark) as previously described (Jauniaux *et al.*, 2001).

Blood samples were collected and a virus neutralisation test with Canine Distemper Virus (CDV) was carried out (Appel and Robson, 1973). In case of viral disease suspicion, Vero cells cultures were infected with a 10 per cent tissue suspensions. Cell cultures were checked at regular intervals for the presence of cytopathogenic changes and at each cell passage (8 days), cell cultures were stained (Diff Quick). The supernatant was examined by negative staining, using a transmission electron microscope (TEM).

RNA was extracted from frozen tissues using TriPure™ Isolation Reagent (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) following the manufacture's instructions. On formalin-fixed, paraffin embedded tissues, the extraction was done using Paraffin block RNA Isolation™ (Ambion, Austin, Texas, USA). Reverse transcriptase was performed with random hexamers for first strand synthesis. For polymerase chain reaction, primers were used with frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissues (Krafft *et al.*, 1995). They amplify the morbillivirus phosphoprotein gene, yielding a 78 base-pair product (Krafft *et al.*, 1995). Reaction was done using the GeneAmp® RNA PCR kit (Perkin Elmer, Roche Molecular Systems, New Jersey, U.S.A.). The PCR product was analysed by gel electrophoresis with 4% agarose and ethidium bromide staining. A formalin-fixed, paraffin-embedded lymph node of a morbillivirus-infected fin whale was used as positive control material. A formalin-fixed, paraffin-embedded lung sample from an unaffected animal was used as a negative control and RT-PCR for β-actin was

performed as a control for amplifiable RNA (Krafft *et al.*, 1995). As RT-PCR has been developed for samples containing degraded RNA (Krafft *et al.*, 1995), the 38 seals were tested.

Results

Animals collection

There were 26 juveniles and 10 adults (age not estimated in 2 cases) distributed as 20 males and 15 females (sex not identified in 3 cases). Carcasses were collected along the coasts (n=31) and 7 seals died at the National Sea Life. From 1990 to 1997, only 6 animals were available for post-mortem examination, against 10 in 1998, 8 in 1999 and 14 in 2000. Fresh carcasses were necropsied a few hours after death or stranding. Other animals were in various stages of preservation and 14 were only partially necropsied due to advanced decomposition.

Gross pathology

Necropsy findings are listed in table 1, excluding animal partially necropsied. The main findings in these 24 seals were emaciation (n= 11), acute pneumonia (n= 7) and enteritis (n= 5).

Body condition

Eleven seals were emaciated, with severe subcutaneous fat reduction and extended amyotrophy. The dorsal fat thickness for common seal varied following nutritional condition (emaciated: 3,9 mm \pm 4,8 ; non-emaciated: 23,2 mm \pm 6,8 ; p < 0,0001), mortality process (traumatic death including by-catch: 23,0mm \pm 7,7; non-traumatic death: 7,0 mm \pm 8,9; p = 0,001) and age (juvenile: 8,5mm \pm 9,2; adult: 22,0 mm \pm 11,1; p = 0,016).

Respiratory system

In case of pneumonia, lungs were congested with irregular surface and interstitial and subpleural emphysema (Figure 1). Sections revealed patches of red and/or grey consolidation. Frothy fluid, containing blood or in some cases pus, was observed in the airways. Most frequently, cranial pulmonary lobes were most heavily affected. In cases of by-catch in fishing nets (confirmed or suspected), animals had extensive lung congestion and oedema with abundant white froth within airways, frequently blood-tinged and subcutaneous haemorrhages. The nematodes *Otostrongylus circumlitus* and *Parafilaroides* sp. were observed in bronchi of five seals and *O. circumlitus* in pulmonary artery of two seals reaching the right ventricle in one case. One animal had bilateral acute pleuritis with fibrinopurulent exsudate in the thoracic cavity and numerous chronic lung abscesses.

Digestive system

In 6 animals, an acute enteritis was characterised by haemorrhagic intestinal content, and enlarged oedematous mesenteric lymph nodes. Two seals had a severe acute peritonitis characterised by fibrinous membranes covering abdominal viscera, associated with traumatic gastric perforation. Numerous petechia were disseminated on the abdominal serosa. In both cases, the perforation was due to a foreign body (metallic piece, 14 cm length, used on fishing lines), one triangular part being in the stomach, the straight extremity in the abdominal cavity (Figure 2). Chronic ulcerative gastritis was observed in two seals and was characterised by 10 mm ulcers disseminated on the gastric mucosa. The ulcer edges were white, thickened and irregular and nematodes were embedded in the centre. Two other seals had free nematodes in the gastric lumen without any associated lesions. One seal presented an acute hiatal hernia. The proximal third of the stomach protruded in the oesophagus, creating a dilatation of the oesophagus extremity. Gastric and oesophageal mucosa were congestive, and melena was present in the gastric lumen.

Myoskeletal system

In two common and two grey seals, numerous subcutaneous and intra-muscular haematomas were disseminated on the head and the thorax. In addition, two of these cases had multiple ribs fracture with associated intercostal hematomas and bilateral hemothorax characterised by 200 to 400 ml of blood in pleural cavities. The four seals were in a good body condition with fresh preys in the stomach. One of these seals was run over by a motorbike when it was resting on the beach while the other one was probably by caught.

Mucosal membranes

Acute ulcerative keratitis was noted in 2 cases with 1 to 5 mm corneal ulcers and periorbital congestion. Acute ulcerative rhinitis and stomatitis were observed in 1 and 2 animals respectively.



Figure 1: subpleural (arrows) and interstitial emphysema.

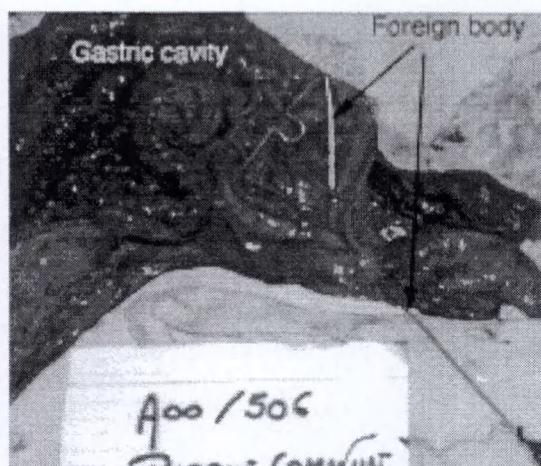


Figure 2: Traumatic gastric perforation

Histopathology

Respiratory system

Acute broncho-pneumonia was characterised by exsudate of neutrophils and large macrophages, in alveoli and bronchioles associated with parenchymal necrosis areas. Interstitial pneumonia, observed on three seals, was characterised by a thickening of the interalveolar septa by macrophages, lymphocytes and oedema, with in one case, a few giant cells. In case of a nematode infestation, eosinophils were also present in interstitial tissue with peribronchial lymphocytes infiltration. In case of by-catch, the main observation was a severe lung congestion, with focal areas of parenchymal oedema characterised by pink fluid, containing erythrocytes within alveoli and respiratory tractus.

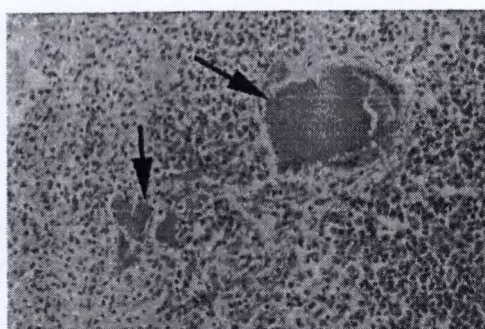


Figure 3: Granulomatous adenitis with Splendore-Hoeppli reaction (arrows)

Digestive system

In three seals, subacute gastritis was characterised by eosinophils and giant cells infiltration in the submucosa. In the most severe case, the gastric wall was thickened and formed an ulcerated nodule. In the submucosa, eosinophil granulomas, some containing nematode larvae, were limited by giant cells. Subacute enteritis was observed in 4 cases, with mild infiltration by eosinophils and few lymphocytes in intestinal villi. No parasites were observed in the lumen of the intestine.

Lymphoid tissue

In the mesenteric and gastric lymph nodes of 3 seals, numerous granulomas composed of eosinophils were disseminated in lymphoid tissue. Frequently, macrophages, giant cells and fibroblasts surrounded the granuloma. Giant cells and few fibroblasts were also frequently disposed around a homogenous and amorphous eosinophilic matrix, positive with P.A.S. staining characterising Splendore-Hoeppli reaction (Figure 3). The cytoplasm of some giant cells stained also positive with P.A.S. In the centre of some granulomas, nematode larvae were present but were not always present. A nematode larva was observed under the capsule of a mesenteric lymph node.

In one seal, few giant cells were present in the thymus without any evidence of another lesion. Most of the time, lymphoid tissue appeared to be depleted.

Nervous tissue and eye

One seal presented a severe acute to subacute meningo-encephalitis. Infiltrate of macrophages and neutrophils was present in the pia mater, in the cerebellum and in the cerebrum. Haemorrhagic and necrotic foci were also disseminated in the cerebrum and cerebellum. A few perivascular cuffs of macrophages and a few lymphocytes were also disseminated in cerebral tissue. On the same seal, a massive infiltrate of macrophages and lymphocytes were observed in the retro-orbital tissue, more frequently around blood vessels.

Liver

Subacute to chronic hepatitis was observed in one case. It was characterised by numerous granulomas, some containing an amorphous eosinophilic matrix P.A.S. positive, specific of a Splendore-Hoeppli reaction, and surrounded by a fibrous wall with fibrocytes, macrophages, lymphocytes and some giant cells.

Mild subacute broncho-interstitial pneumonia with case of acute broncho-pneumonia, meningeal congestion with case of acute meningoencephalitis and lymphoid depletion were previously described, associated with morbillivirus infection (Jauniaux *et al.*, 2001).

Bacteriology

Escherichia coli was identified from blood, lung and bone marrow of three seals. *Aeromonas hydrophila* was identified from the blood and brain of one seal, and haemolytic *Streptococcus* sp. (group antigen G) was isolated from the lung, the intestine, the eye and the bone marrow of one seal. An unidentified β - haemolytic germ was isolated from eye, lung and blood of one animal, all findings being consistent with a bacteremia or septicemia.

S. phocae and *A. hydrophila* were isolated from lungs of a seal with acute pneumonia.

Morbillivirus detection

The results of investigations for morbillivirus infection are listed in table 2. In addition of the seven seals infected by the morbillivirus during the 1998 summer (Jauniaux *et al.*, 2001), five other cases were positive by immunohistochemistry (n=2) or RT-PCR (n=5). On one seal stranded in 1999, heavy immunofluorescence was detected in the lung, typical paramyxovirus viral particles were observed by negative staining from lung tissue, and intracytoplasmic specific labelling was detected in lymphocytes of the spleen using PDV 1.3 Mab. Heavy intracytoplasmic and intranuclear labelling were also detected in lymphocytes of the bronchial lymph node, the tonsil as well as in the lung tissue (alveolar and bronchiolar macrophages and epithelium of bronchiolar glands) of a seal stranded in France (December 18,1999).

On the 12 seals positive by RT-PCR, fragments of the expected size of about 78 base-pair were generated from various frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. The fragments were similar to the positive control lymph node. RT-PCR was positive for β -actin but negative for negative control. In two cases, specific fragments were amplified from tissues of seals considered as being by caught.

Causes of death

Two categories of causes of death can easily be identified on well preserved carcasses: those related to a chronic morbid process, usually associated with infectious lesions

(bronchopneumonia, septicaemia and enteritis) and those related to an acute morbid process, usually associated with non-infectious lesions (by-caught, trauma).

Out of the six cases of seals with septicaemia, five seals were infected by the morbillivirus. Bronchopneumonia was related to bacterial infection secondary to morbillivirus or nematodes infection.

Many seals showed evidence of capture in fishing nets and various traumas. In seven cases, asphyxia due to by-catch in fishing nets was considered to be the cause of death. Two animals were known by-catches, kept by fishermen, while five others had probably been thrown back into water after capture. Indeed, all were in a good nutritional condition, without evidence of a severe disease. However, all had subcutaneous haemorrhages and the previously described lung lesions. Other traumas were gastric perforation, death being associated with the severe acute peritonitis and rib fractures responsible for an extensive hemothorax. In such cases, hypotension and/or hypovolemic shock could be considered as the cause of death.

Discussion

Emaciation

Emaciation is a frequent observation amongst seals stranded along the Belgian and northern French coastline (Jauniaux *et al.*, 2001) as well as on English coast, reported as starvation (Baker, 1989), or malnutrition on live stranded animals (Barnett *et al.*, 2000). In addition, emaciation, as observed in the present analysis, is more frequently observed on pups (Gerber *et al.*, 1993; Baker *et al.*, 1998). Finally, weight loss of seal pups after weaning is a normal situation and it can last for several weeks (Bonner, 1989). Emaciation may be the direct cause of death or may cause death by hypothermia by the loss of insulating subcutaneous fat (Baker, 1989; Baker *et al.*, 1998). In our investigations, nutritional status was also related to the cause of death, animals dying of infectious diseases being severely emaciated. For grey seals, it was suggested that premature mother-pup separation, due to bad weather or disturbance, could lead to pup emaciation (Barnett *et al.*, 2000). Morbillivirus infected dogs (Dungworth, 1993), cetaceans (Duignan *et al.*, 1992; Kennedy *et al.*, 1992; Jauniaux *et al.*, 2000) and seals are frequently reported as being emaciated (Munro *et al.*, 1992; Forsyth *et al.*, 1998; Jauniaux *et al.*, 2001). Emaciation in morbillivirus infected seals could be evidence of chronic disease (Baker, 1992).

Infectious lesions

Half of the seals in our investigations showed evidences of infectious diseases. A proportion of 58% was reported for grey seals stranded on the British coastline (Baker, 1989). Among

infectious diseases on stranded seals, most frequent lesions reported were pneumonia and gastro-enteritis (Baker, 1989; Gerber *et al.*, 1993; Baker *et al.*, 1998).

In our analyses, bronchopneumonia, septicaemia, enteritis and encephalitis were diagnosed on many seals, most of them being infected by a morbillivirus. Severe lymphoid depletion responsible for immunosuppression as frequently reported in morbillivirus infected pinnipeds (Krogsrud *et al.*, 1990; Belykh *et al.*, 1997; Kennedy *et al.*, 2000) that can lead to such secondary diseases. Bronchopneumonia can also be secondary to lung worms (*O. circumlitus* and *Parafilaroides* sp.) infestation (Measures, 2001). But, although frequently reported in seals and more obviously in juveniles older than 3 months (Van der Kamp, 1987), few cases of parasite infestation were reported in our investigations.

During the 1998 summer, seven seals that stranded on the Belgian and French coastlines, were infected by the morbillivirus (Jauniaux *et al.*, 2001). Since, five other seals were considered to be infected by the virus. The morbillivirus infection was diagnosed as following : specific immunolabelling, serological evidence, typical viral particles observed by TEM after cell culture and specific fragments amplified by RT-PCR. These findings suggest that a morbillivirus disease caused the seals stranding and that sporadic cases continued to occur in the southern bight of the North Sea. Among the 12 animals positive with the RT-PCR technique, only 6 seals were positive by immunohistochemistry, but many seals were too autolysed to allow immunohistochemical analyses. Indeed, the RT-PCR protocol, yielding a 78 base pair product has been developed by Krafft *et al.* (1995) as a diagnostic test for samples containing degraded RNA from either formalin-fixed tissues paraffin embedded tissues or from autolyzed tissues (Lipscomb *et al.*, 1996). This corresponds to most of the samples collected from stranded marine mammals.

Post-mortem findings in seals with distemper were similar to those reported in other seals population (Kennedy *et al.*, 1989; Krogsrud *et al.*, 1990; Nunoya *et al.*, 1990; Daoust *et al.*, 1993; Duignan *et al.*, 1993; Bergman *et al.*, 1990). Interstitial pneumonia has previously been reported in morbillivirus-infected seals (Kennedy *et al.*, 1989; Duignan *et al.*, 1993). No pulmonary syncytia were observed but are not constant findings (Krogsrud *et al.*, 1990; Heje *et al.*, 1991; Kennedy *et al.*, 2000), which are more frequently noted in cetaceans (Domingo *et al.*, 1992; Kennedy, 1998).

The multinucleated cells observed in lymph nodes were consistent with giant cells associated with parasitic larvae as observed on some slides.

All morbillivirus infected seals were pups in their weaning period, corresponding with the loss of passively acquired maternal immunity, leading to a high susceptibility to PDV infection (Harder *et al.*, 1993). As the majority of the Dutch Wadden Sea seals population, including

juvenile seals which have lost their maternal antibodies, had morbillivirus-specific antibodies, it was suspected that PDV infections would continue to occur in that area (Visser *et al.*, 1993). Finally, higher susceptibility of juvenile could be related to immune system development (Thompson *et al.*, 1992). Indeed, Thompson *et al.* (1992) reported that seropositive juvenile seals had lower antibody titres than seropositive adults.

Another reason for the emergence of seal distemper in 1998 could be the introduction in the Southern North Sea of a seal species considered as a vector. Indeed, the sudden die-off of common seals in 1988 could be related to the unusual presence of harp seals (*Phoca groenlandica*) in the North Sea in 1987, seals coming from the Barents sea (Goodhart, 1988; McGoutry, 1988; Heide-Jorgensen *et al.*, 1992). The unusual presence of infected individuals of this species may have introduced infection to naive seal populations (Kennedy, 1998). Indeed, common seals in Europe were unexposed before 1988, being seropositive only after the 1988 epizootic (Thompson *et al.*, 1992) while ringed seals (*Phoca hispida*) and harp seals collected in Greenland were seropositive for CDV as early as 1985, without associated disease. The immunological status of harp seals entering the North Sea in 1987 is unknown, but harp and hooded seals sampled in 1991 and 1992 in the Barents Sea had CDV and PDV antibodies without clinical or pathological evidence of distemper (Stuen *et al.*, 1994). Recent observations of hooded seals along the Belgian coast, southward of their normal migratory route could be a vector of the morbillivirus.

Non-infectious lesions

On 24 seals completely necropsied, 12 showed evidences of trauma. In our study, only two seals were brought back by fishermen but 5 others were considered as being trapped in fishing nets on the base of gross pathology. One of those had an extensive hemothorax but also net marks. Seals are frequent victims of fishing nets but captures are not considered as a threat for these species (Northridge, 1985; Northridge, 1992). For grey seals, net entrapment is responsible for the death of 30% of juveniles (Baker *et al.*, 1998).

Another form of interaction with fisheries was the gastric perforation. Indeed, the foreign body was identified in the two cases as a system used on fishing lines to separate each line from another. Similar injuries associated with foreign body ingestion such as fishhooks have been reported on seals leading in some cases to gastro-intestinal perforation, responsible for peritonitis (Gulland *et al.*, 2001).

On the 4 seals with evidence of trauma, one was crushed on the beach by a motorbike, another one was caught in a fishing net. The origin of the trauma of the two other cases could not be determined. Trauma with extensive internal haemorrhage and fractures of skull or ribs is

a frequent observation on young grey seals most of them with an unknown origin (Baker *et al.*, 1998). As one grey seal was found in Belgian harbour, the collision with a ship seems to be the most likely cause of the trauma. Similar incidents were previously reported for seals stranded along the British coast (Baker, 1989).

Other lesions

Splendorre-Hoepli reactions have been described in mesenteric lymph node of a common seal, associated with aberrant parasitic larvae (Munro *et al.*, 1992) and with botryomycotic lesions in a harp seal (Daoust *et al.*, 1994). Splendorre-Hoepli material, probably composed of glycoprotein antigen-antibody complexes, could also be seen in foreign-body reactions. In the cases that we have reported, the reaction seemed to be associated with parasite larvae migration.

Conclusions

Two categories of lesions and causes of death appeared when considering seals stranded along the Belgian and northern French coastline between 1990 and 2000 : those related to a chronic process associated with infectious conditions and those related to acute process associated with trauma.

Among the infectious diseases, the most of them were bronchopneumonia, septicaemia, gastro-enteritis and encephalitis and were frequently associated with morbillivirus infection. Some cases of pneumonia were also related to lung worms infestation. Animals with evidence of infectious diseases were usually emaciated, revealing a long debilitating process. Traumas were related to net entrapment, collision and foreign body ingestion. All those animals were in good nutritional status.

Many reasons can explain the recent rise in seals stranding, the most important being linked to the 1998 epizootic with further sporadic cases and the second being the presence of seal species not previously observed in the area. In addition, co-operation with France and the presence of a rehabilitation centre will also explain the augmentation of seals available for necropsy.

It would be necessary to further characterise the virus involved in order to compare it with other strains known to have previously affected seals. Further investigations, using RT-PCR amplification of larger viral RNA sequences of the phosphoprotein gene are in progress and will allow us such comparison (Barrett *et al.*, 1993; Taubenberger *et al.*, 2000).

Acknowledgements

The authors thank the Centre de Recherche sur les Mammifères Marins (La Rochelle, France), the Céto-club and the volunteers who helped us to collect and necropsy seals. We also acknowledge A. Trudgett for the monoclonal antibody to the phocine distemper virus, and A. Villers, M. Sarlet, M.P. Desmecht, and F. Verdebout for technical assistance. The authors are very grateful to E. Thiry for stimulating discussion and providing useful comments to the manuscript. This work was funded by the Belgian State - Prime Minister's Service, Office for Scientific, Technical and Cultural Affairs (MN/DD/51).

References

- Appel, M. and Robson, D.S. (1973). A microneutralization test for canine distemper virus. *American Journal of Veterinary Research*, **34**, 1459-1463.
- Baker, J.R. (1989). Natural causes of death in non-suckling grey seals (*Halichoerus grypus*). *Veterinary Record*, **125**, 500-503.
- Baker, J.R. (1992). The pathology of phocine distemper. *Science of the total environment*, **115**, 1-7.
- Baker, J.R., Jepson, P.D., Simpson, V.R. and Kuiken, T. (1998). Causes of mortality and non-fatal conditions among grey seals (*Halichoerus grypus*) found dead on the coasts of England, Wales and the Isle of Man. *Veterinary Record*, **142**, 595-601.
- Barnett, J.E.F., Woodley, A.J., Hill, T.J. and Turner, L. (2000). Conditions in grey seal pups (*Halichoerus grypus*) presented for rehabilitation. *Veterinary Record*, **147**, 98-104.
- Barrett, T., Visser, I.K.G., Mamaev, L., Goatley, L., van Bresse, M.F. and Osterhaus, A.D.M.E. (1993). Dolphin and porpoise morbilliviruses are genetically distinct from phocine distemper virus. *virology new york*, **193**;2, 1010-1021.
- Belykh, O., Goldberg, O., Likhoshway, Y. and Grachev, M. (1997). Light, electron and immuno-electron microscopy of organs from seals of Lake Baikal sampled during the morbillivirus infection of 1987-1988. *European Journal of Veterinary Pathology*, **3**, 133-145.
- Bergman, A., Jarplid, B. and Svensson, B.M. (1990). Pathological findings indicative of distemper in European seals. *Veterinary Microbiology*, **23**, 331-341.
- Daoust, P-Y, Haines, D.M., Thorsen, J., Duignan, P.J. and Geraci, J.R. (1993). Phocine distemper in a harp seal (*Phoca groenlandica*) from the gulf of St. Lawrence, Canada. *Journal of Wildlife Diseases*, **29**, 114-117.
- Daoust, P.Y., Taylor, R.G. and Greenlaw, B.L. (1994). Herpesvirus in botryomycotic lesions from a harp seal (*Phoca groenlandica*). *Veterinary Pathology*, **31**, 385-387.
- Domingo, M., Visa, J., Pumarola, M., Marco, A.J., Ferrer, L., Rabanal, R. and Kennedy, S. (1992). Pathologic and immunocytochemical studies of morbillivirus infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Veterinary Pathology*, **29**, 1-10.
- Duignan, P.J., Geraci, J.R., Raga, J.A. and Calzada, N. (1992). Pathology of morbillivirus infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from Valencia and Murcia, Spain. *Canadian Journal of Veterinary Research*, **56**, 242-248.

- Duignan, P.J., Sadove, S., Saliki, J.T. and Geraci, J.R. (1993). Phocine distemper in harbour seals (*Phoca vitulina*) from Long Island, New York. *Journal of Wildlife Diseases*, **29**, 465-469.
- Duignan, P.J., Saliki, J.T., St.Aubin, D.J., Early, G., Sadove, S., House, J.A., Kovacs, K. and Geraci, J.R. (1995). Epizootiology of morbillivirus infection in North American harbor seals (*Phoca vitulina*) and gray seals (*Halichoerus grypus*). *Journal of Wildlife Diseases*, **31**, 491-501.
- Dungworth, D.L. (1993). The respiratory system. In: *Pathology of domestic animals*, K.V.F. Jubb, sP.C. Kennedy and N. Palmer. Eds, Academic Press, San Diego, 617.
- Forsyth, M.A., Kennedy, S., Wilson, S., Eybatov, T. and Barrett, T. (1998). Canine distemper virus in a Caspian seal. *Veterinary Record*, **143**, 662-664.
- Geraci, J.R. and Lounsbury, V.J. (1993). Marine mammals ashore : a field guide for strandings. Texas A&M sea grant publication. Galveston.
- Gerber, J.A., Roletto, J., Morgan, L.E., Smith, D.M. and Gage, L.J. (1993). Findings in pinnipeds stranded along the central and northern California coast, 1984-1990. *Journal of Wildlife Diseases*, **29(3)**, 423-433.
- Goodhart, C.B. (1988). Did virus transfer from harp seals to common seals? *Nature*, **336**, 21.
- Grachev, M., Kumarev, V.P., Mamaev, L.V., Zorin, V.L., Baranova, L.V., Denikina, N.N., Belikov, S.I., Petrov, E.A., Kolesnik, V.S., Kolesnik, R.S., Dorofeev, V.M., Beim, A.M., Kudelin, V.N., Nageiva, F.G. and Sidorov, V.N. (1989). Distemper virus in Baikal seals. *Nature*, **338**, 209.
- Gulland, F.M.D., Lowenstine, L.J. and Spraker, T. (2001). Noninfectious diseases. In: *Handbook of marine mammal medicine*, L.A. Dierauf and M.D. Gulland. Eds, CRC press, Boca Raton, 521.
- Harder, T.C., Stede, M., Willhaus, T., Schwarz, J., Heidemann, G. and Liess, B. (1993). Morbillivirus antibodies of maternal origin in harbour seal pups (*Phoca vitulina*). *Veterinary Record*, **132:25**, 632-633.
- Heide-Jorgensen, M.-P., Harkonen, T., Dietz, R. and Thompson, P.M. (1992). Retrospective of the 1988 European seal epizootic. *Diseases of Aquatic Organisms*, **13**, 37-62.
- Heje, N.-I., Henriksen, P. and Aalboek, B. (1991). The seal death in Danish waters 1988 1. Pathological and bacteriological studies. *Acta veterinaria scandinavia*, **32**, 205-210.
- Jauniaux, T., Charlier, G., Desmecht, M., Haelters, J., Jacques, T., Losson, B., Van Gompel, J., Tavernier, J. and Coignoul, F. (2000). Pathological findings in two fin whales (*Balaenoptera physalus*) with evidence of morbillivirus infection. *Journal of Comparative Pathology*, **123**, 198-201.
- Jauniaux, T., Boseret, G., Desmecht, M., Haelters, J., Manteca, C., Tavernier, J., Van Gompel, J. and Coignoul, F. (2001). Morbillivirus in common seals stranded on the coasts of Belgium and northern France during summer 1998. *Veterinary Record*, **148**, 587-591.
- Kennedy, S., Smyth, J.A., Cush, P.F., Duignan, P.J., Platten, M., McCullough, S.J. and Allan, G.M. (1989). Histopathologic and immunocytochemical studies of distemper in seals. *Veterinary Pathology*, **26**, 97-103.
- Kennedy, S. (1990). A review of the 1988 European seal morbillivirus epizootic. *Veterinary Record*, **127**, 563-567.
- Kennedy, S., Kuiken, T., Ross, H.M., McAliskey, M., Moffett, D., McNiven, C.M. and Carole, M. (1992). Morbillivirus infection in two common porpoises (*Phocoena phocoena*) from the coasts of England and Scotland. *Veterinary Record*, **131**, 286-290.

- Kennedy, S. (1998). Morbillivirus infections in aquatic mammals. *Journal of Comparative Pathology*, **119**, 201-225.
- Kennedy, S., Kuiken, T., Jepson, P.D., Deaville, R.C., Forsyth, M.A., Barrett, T., van de Bildt, M.W.G., Osterhaus, A.D.M.E., Eybatov, T., Duck, A., Kydyrmanov, A., Mitrofanov, I. and Wilson, S. (2000). Mass die-off of Caspian seals caused by canine distemper virus. *Emerging Infectious Diseases*, **6**, 637-639.
- Kennedy-Stoskopf, S. (2001). Viral diseases. In: *Handbook of marine mammal medicine*, L.A. Dierauf and M.D. Gulland. Eds, CRC press, Boca Raton, 285.
- Krafft, A., Lichy, J.H., Lipscomb, T.P., Klaunberg, B.A., Kennedy, S. and Taubenberger, J.K. (1995). Postmortem diagnosis of morbillivirus infection in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Atlantic and Gulf of Mexico epizootics by polymerase chain reaction-based assay. *Journal of Wildlife Diseases*, **31**, 410-415.
- Krogsrud, J., Evensen, O., Holt, G., Hoie, S. and Markussen, N.H. (1990). Seal distemper in Norway in 1988 and 1989. *Veterinary Record*, **126**, 460-461.
- Lipscomb, T.P., Kennedy, S., Moffett, D., Krafft, A., Klaunberg, B.A., Lichy, J.H., Regan, G.T., Worthy, G.A.J. and Taubenberger, J.K. (1996). Morbilliviral epizootic in bottlenose dolphins of the gulf of Mexico. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **8**, 283-290.
- McGoutry, C. (1988). Species jump may be responsible for seals' virus infection. *Nature*, **335**, 3.
- Measures, L.N. (2001). Lungworms of marine mammals. In: *Parasitic diseases of wild mammals*, W. Samuel, S.M. Pybus and A. Kocan. Eds, Manson, London, 279.
- Munro, R., Ross, H.M., Cornwell, C. and Gilmour, J. (1992). Disease conditions affecting common seals (*Phoca vitulina*) around the Scottish mainland, September-November 1988. *Science of the total environment*, **115**, 67-82.
- Northridge, S.P. (1985). Etude des interactions entre les mammifères marins et les pêcheries au niveau mondial. *FAO Doc Tech Pêches*, **251**,
- Northridge, S.P. (1992). Mise à jour de l'étude des interactions entre les mammifères marins et les pêcheries au niveau mondial. *FAO Doc Tech Pêches*, **251**,
- Nunoya, T., Tajima, M., Ishikawa, Y., Samejima, T., Ishikawa, H. and Hasegawa, K. (1990). Occurrence of a canine distemper-like disease in aquarium seals. *Japanese journal of veterinary science*, **52**, 469-477.
- Osterhaus, A.D.M.E., Groen, J., UytdeHaag, F.G.C.M., Visser, I.K.G., v.d.Bildt, M.W.G., Bergman, A. and Klingeborn, B. (1989). Distemper virus in Baikal seals. *Nature*, **339**, 209-210.
- Stuenkel, S., Have, P., Osterhaus, A.D.M.E., Arnemo, J.M. and Moustgaard, A. (1994). Serological investigation of virus infections in harp seals (*Phoca groenlandica*) and hooded seals (*Cystophora cristata*). *Veterinary Record*, **134**, 502-503.
- Taubenberger, J.K., Tsai, M., Atkin, J., Fanning, T.G., Krafft, A., Moeller, R.B., Kodosi, S.E., Mense, M.G. and Lipscomb, T.P. (2000). Molecular genetic evidence of a novel morbillivirus in a long-finned pilot whale (*Globicephalus melas*). *Emerging Infectious Diseases*, **6**, 42-45s.
- Thompson, P.M., Cornwell, H.J.C., Ross, H.M. and Miller, D. (1992). Serologic study of phocine distemper in a population of harbour seals in Scotland. *Journal of Wildlife Diseases*, **28**, 21-27.
- Trudgett, A., Lyons, C., Welsh, M.J., Duffy, N., McCullough, S.J. and McNeilly, F. (1991). Analysis of a seal and a porpoise morbillivirus using monoclonal antibodies. *Veterinary Record*, **128**, 61.

Van der Kamp, J.S. (1987). Pulmonary diseases in seals: a histopathological review. *Aquatic Mammals*, **13**, 122-124.

Visser, I.K.G., Vedder, E.J., Vos, H.W., van de Bildt, M.W.G. and Osterhaus, A.D.M.E. (1993). Continued presence of phocine distemper virus in the Dutch Wadden Sea seal population. *Veterinary Record*, **133**, 320-322.

10.4. Etude 4 : Postmortem investigations on winter stranded sperm whales from the coasts of Belgium and the Netherlands

THIERRY JAUNIAUX¹ , LAURENCE BROSENS¹ , ERIC JACQUINET¹ , DENIS LAMBRIGTS¹ ,
MARJAN ADDINK² , CHRIS SMEENK² , FREDDY COIGNOUL¹

¹ Department of Pathology, Veterinary College, University of Liege,
Sart Tilman B43, 4000 Liege, Belgium

² National Museum of Natural History, P.O. Box 9517,
2300 RA Leiden, The Netherlands

Journal of Wildlife Diseases, 1998, **34**, 99-109.

ABSTRACT: During winter 1994-1995, four and three sperm whales (Physeter macrocephalus) were stranded along the Belgian and the Dutch coast, respectively. Necropsies and tissue samplings were conducted about 24 hrs after death. Significant lesions, observed on several whales, were round and linear skin scars, ventral skin abrasions, acute skin ulcers, acute ulcerative stomatitides, acute to chronic external otitides, and visceral passive congestion. In addition, sperm whales appeared debilitated with severe weight deficit, blubber thickness reduction, and the absence of abdominal fat, and the intestinal tracts were almost empty. Three categories of lesions and their possible relation with the stranding were evaluated. The various cutaneous scars observed on the seven whales appeared to have no relation with the stranding. The poor body condition and acute integument ulcerative lesions were present before the stranding. Ventral skin abrasions and visceral passive congestion were caused by the strandings. Absence of food in the alimentary tracts, evidence of weight loss and blubber thickness reduction were compatible with an extended presence of the sperm whales in the North Sea, where adequate food is not available. This might lead to progressive weakness, predisposing the animals to secondary pathogene such as viral diseases. Finally, the coastal configuration of the southern North Sea makes it a trap for sperm whales which have entered the area during their wanderings.

Key words: sperm whale, Physeter macrocephalus, pathology, mass strandings, ulcerative integument lesions, poor body condition, North Sea.

INTRODUCTION

Mass strandings of whales and dolphins have always intrigued people and must have occurred from the time cetaceans have been present in the oceans (Walsh et al., 1990). Such stranding has been defined as an event where two or more animals run ashore alive at roughly the same place and time (Geraci and Lounsbury, 1993). Many theories have attempted to explain that phenomenon; in most cases, it cannot be attributed to a single cause, but is the result of a complex interaction of physical and biological factors such as ocean currents, tides and coastal configuration, the animals' migratory and social behavior, food availability, echolocation or orientation failure, and long-standing diseases which have debilitating effects (Cordes, 1982; Walsh et al., 1990; Geraci and Lounsbury, 1993).

Several mass strandings of sperm whales (Physeter macrocephalus), the largest of toothed whales (Odontoceti), occurred in the North Sea during the winter 1994-1995 (Fig. 1). Sperm whales are highly pelagic animals and are normally found in deep oceanic waters. Their

main food is mesopelagic squid, which is caught at depths of up to 1,000 m, or more (Rice, 1989). Sperm whales live in groups which often show a strong social cohesion. Females and calves remain on the breeding grounds in warm to warm-temperate waters. Males leave the female herds when they reach puberty, and adult males perform long-distance migrations far into higher latitudes (Best, 1979; Rice, 1989). In the northeastern Atlantic Ocean, sperm whale bulls are often observed west of the British Isles and off the coast of Norway (Evans, 1991; Berrow et al., 1993). They avoid shallow waters and do not normally enter the North Sea, where physical and ecological conditions are totally unsuitable (Smeenk and Addink, 1993; Evans, 1991). Most sperm whale strandings in Europe are of single animals and usually occur on the Atlantic coast (Camphuysen, 1995; Berrow et al., 1993). However, mass strandings do occur and the great majority of those have been reported from the southern North Sea. This area is well outside the species' normal range and its coastline is characterized by intricate systems of sandbanks, mudflats, sandy islands and estuaries (Smeenk and Addink, 1993).

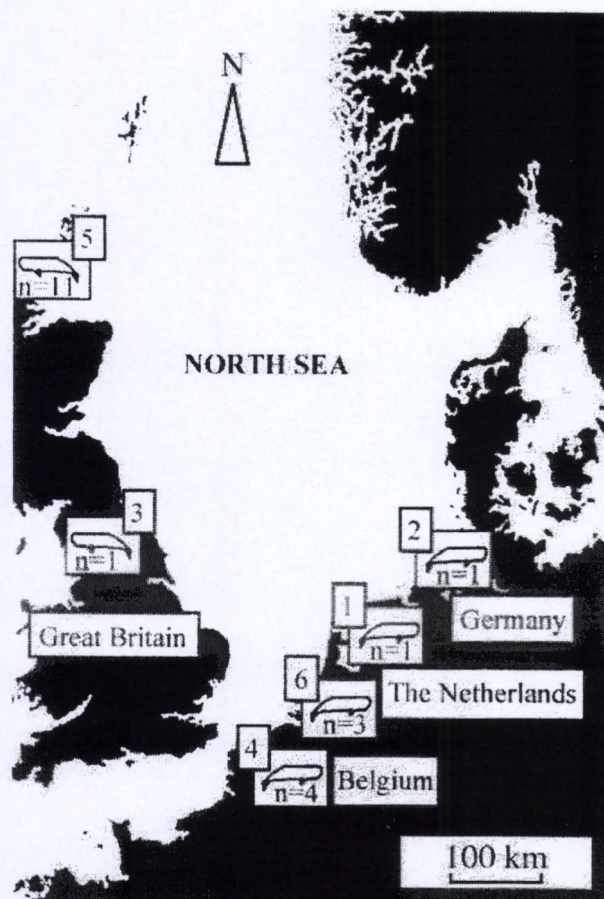


Figure 1: Sperm whale strandings recorded in the North Sea during the winter 1994-95 including (1) Terschelling on 3 November 1994, (2) Baltrum on 5 November 1994, (3) Whitby on 10 November 1994, (4) Koksijde and Nieuwpoort on 18 November 1994, (5) Orkney on 9 December 1994, and (6) Scheveningen on 12 January 1995; (n=number of animals)

Few reports on pathology of sperm whales are available and these pertain to animals killed in commercial whaling operations (Cockrill, 1960a, 1960b; Uys and Best, 1966; Lambertsen et al., 1987; Lambertsen and Kohn, 1987). Data on pathology of sperm whales from mass strandings are virtually absent. Obviously, handling such animals on the beach and carrying out an adequate necropsy are extremely difficult, and require well coordinated teams including veterinary pathologists, and heavy equipment. In addition, necropsies should be done on fresh carcasses, since postmortem decay soon affects the quality of tissues and pathological findings. Nevertheless, accurate descriptions of lesions as well as attempts to determine their origin are prerequisites to evaluate the causes of death and the background to the stranding.

This paper describes postmortem observations on seven sperm whales stranded along the Belgian and Dutch coasts during the 1994-95 winter. The possible causes of those strandings are discussed in the light of our post-mortem findings, findings of other strandings in the North Sea, and current knowledge on biology of sperm whales.

MATERIALS AND METHODS

On 18 November 1994, three fresh beached sperm whales were discovered dead at Koksijde (51°08'N, 02°39'E), Belgium. A fourth sperm whale, probably from the same group, was found dead in shallow waters near the beach at Nieuwpoort (51°09'N, 02°43'E), 10 km east from the first stranding area. It was dragged ashore later the same day. On 12 January 1995, three sperm whales were found alive on the beach of Scheveningen (52°05'N, 04°15'E), the Netherlands. They died 4 hr after their discovery.

With the exception of the animal stranded in Nieuwpoort which was severely decayed, all whales were necropsied and sampled about 24 hrs after death. A standardized procedure derived from the protocol for necropsy on small cetaceans (Kuiken and García Hartmann, 1991) was used on each carcass. Body measurements were taken and blubber thickness was measured at the caudal insertion of the dorsal fin. Samples of various organs and lesions were collected for histopathological examination and fixed in 10% buffered formalin. They were embedded in paraffin and 5 µm sections were stained with hematoxylin and eosin (H & E) stain. Sections of skin and oral mucosa were stained with Feulgen stain for evidence of nucleic acid (Bancroft and Cook, 1996) and sections of ear canal were stained with periodic acid Schiff (PAS) for fungi (Cook, 1996). Selected sections were stained by an immunoperoxidase technique for morbillivirus antigen detection using monoclonal antibody clone PDV 1.3 (Kennedy et al., 1991; Trudgett et al., 1991; Domingo et al., 1992). Lung sections from

morbillivirus-infected dolphins were used as positive controls (Domingo et al., 1992). For electron microscopy, selected formalin-fixed tissues were transferred to 2.5% glutaraldehyde in phosphate buffer, rinsed, post-fixed with osmium tetroxide, and embedded in epoxy resin (EM bed. 812, Electron Microscopy Sciences, Box 251, Fort Washington, Pennsylvania 19034).

Intestinal contents were aseptically collected for bacteriological examination by culture on Columbia Blood agar with 5 % sheep blood (Becton Dickinson Benelux s.a., Denderstraat 24, 9440 Eredebodegem, Belgium) and on selective medium for *Enterobacteriaceae* (Gassner agar, Merck, Merck-Belgolabo s.a., Brusselsesteenweg 288, 3090 Overijse, Belgium) and incubated overnight in aerobic and anaerobic conditions. In addition, blowhole and external ear duct swabs were sampled on two and one sperm whales from Belgium and the Netherlands, respectively. For parasitology, intestinal contents were sampled, parasites were collected and preserved in 70% ethanol prior to identification.

Location and identification	Length (m)	Blubber (mm)	Age (Dentinal GLG count) ^a
<u>Koksijde</u>			
Sperm whale 1	15.4	160	24 ^b
Sperm whale 2	14.9	160	22 ^c
Sperm whale 3	14.4	150	28
<u>Nieuwpoort</u>			
Sperm whale 4	18.2	150	>29
<u>Scheveningen</u>			
Sperm whale A	15.2	110	>31
Sperm whale B	15.4	120	>>26
Sperm whale C	15.3	106	nd ^d

TABLE 1: Body measurements, age and weight of sperm whales stranded on the Belgian and Dutch coasts during the winter 1994-95; a GLG growth layer groups; b worn tooth crown; c very worn tooth crown; d not determined

The sperm whales stranded along coast of Belgium were weighed at the process plant at the time of carcass disposal. Weight was corrected for body fluid loss during necropsy and transport (Lockyer, 1991) and a predictive formula of normal weight was used from measured length (Lockyer, 1991). Teeth were collected and forwarded to the Sea Mammal Research Unit (Cambridge, United Kingdom; C. Lockyer) for age determination by counting the growth layer groups.

RESULTS

All seven animals examined were adult males, about 15 m long; the one found near Nieuwpoort was 18 m long (Table 1). Blubber thickness was about 16 cm in sperm whales from Belgium, ≤ 12 cm in those from the Netherlands. Age determination (Table 1) revealed that the whale from Nieuwpoort, the largest, was > 29 yr old. Some teeth were so worn that the age could not be precisely determined. Body mass at necropsy, corrected and estimated weights are presented in Table 2. The whale stranded at Nieuwpoort weighed more than 34,000 kg. Lesions observed on each animal, listed in Table 3, are described below.

Location and identification	Length (m)	Weight ^a (kg)	Corrected weight ^b (kg)	Estimated weight ^c (kg)
Koksijde				
Sperm whales 1 + 2	15.4 and 14.9	60,870 ^d	70,000 ^d	74,800 ^d
Sperm whale 3	14.4	19,245	21,940	32,500
Nieuwpoort				
Sperm whale 4	18.2	34,205	38,994	61,800

TABLE 2 : Length, weight (observed and corrected) and predicted normal weight of sperm whales stranded on the Belgian coast, 1994. a Weight at the process plant at the time of carcass disposal, after partial dissection on the beach; b Correction factor 1.14 was used to compensate for loss of body fluids during dissection and transport (Lockyer, 1991); c Predictive formula of normal weight was used from measured length as : $W = 0.0218 \times L^{2.74}$ (Lockyer, 1991); d combined weight

Several parallel linear white scars 15 to 25 cm in length and 1 cm in width and several starry white spotty scars were observed on the heads of all seven animals. Slightly hemorrhagic skin ulcerations also were present on the ventral lower abdomen, on the longitudinal midline and laterally, around the genital area and on the tail of the animals from Koksijde and Scheveningen.

Unusual lesions on two of the sperm whales from Belgium were three to four acute ulcers on the midline of the hard palate (Fig. 2). Those lesions were elongated, 2 to 10 cm in length and 4 cm in width, with irregular edges. They were red-brown, with hemorrhagic fluid oozing from the lesions, and some ulcers were covered by fibrin. Similar lesions, ≤ 30 cm long, were observed on the three animals from the Netherlands (Fig. 3). Round to oval ulcers, 4 to 5 cm in diameter, with raised, irregular, whitish edges, were present on the dorsal and lateral sides of the tail stock of one sperm whale from Belgium. Round and white erosions of 2 to 3 cm in diameter with slightly raised and rough edges were observed on the head of one whale from the Netherlands (Fig. 4).

Location and identification	Chronic skin lesions	Ventral abrasions	Acute skin ulcers	Acute ulcerative stomatitis	External otitis	Blubber or intestinal nodules	Visceral congestion	Gastric nematodes	Acute ulcerative tonsillitis
<u>Koksijde</u>									
Sperm whale 1	+ ^a	+	- ^b	-	? ^c	+	+	-	?
Sperm whale 2	+	+	-	+	?	+	+	+	?
Sperm whale 3	+	+	+	+	+	-	+	+	?
<u>Nieuwpoort</u>									
Sperm whale 4	+	-	-	-	?	?	?	?	?
<u>Scheveningen</u>									
Sperm whale A	+	+	+	+	+	+	+	+	?
Sperm whale B	+	+	-	+	+	+	+	+	?
Sperm whale C	+	+	-	+	+	+	+	+	+

TABLE 3: Pathological findings observed in sperm whales stranded on the Belgian and Dutch coasts during the winter 1994-95; a = lesion observed; b = lesion not observed; c = organ not examined

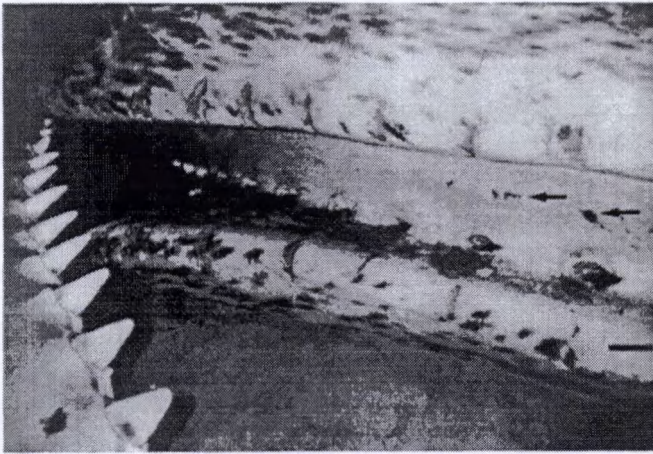


Figure 2: Mouth of sperm whale from stranding on Belgian coast showing acute ulcers (arrow) on the midline of the hard palate, and segmental lacerations on the lips which are postmortem artifacts. (Bar = 10 cm).

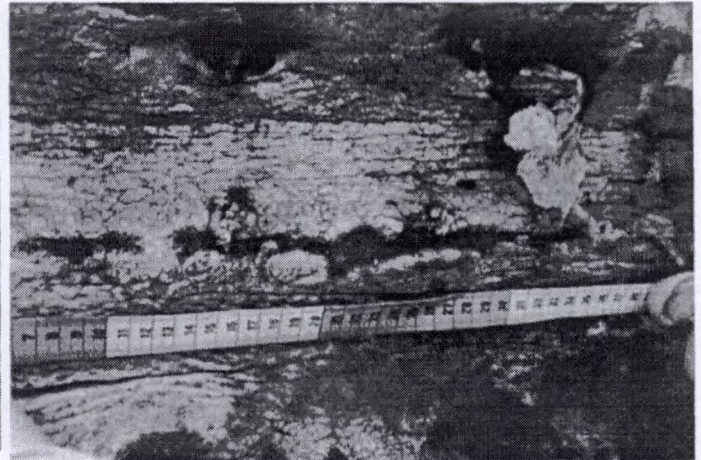


Figure 3: Mouth of sperm whale stranded on Dutch coast with large acute ulcers (30 cm long) on the midline of the hard palate.



Figure 4: Head of sperm whale stranded on coast of the Netherlands showing slight skin erosion with raised, rough edges, and dark gray outline.

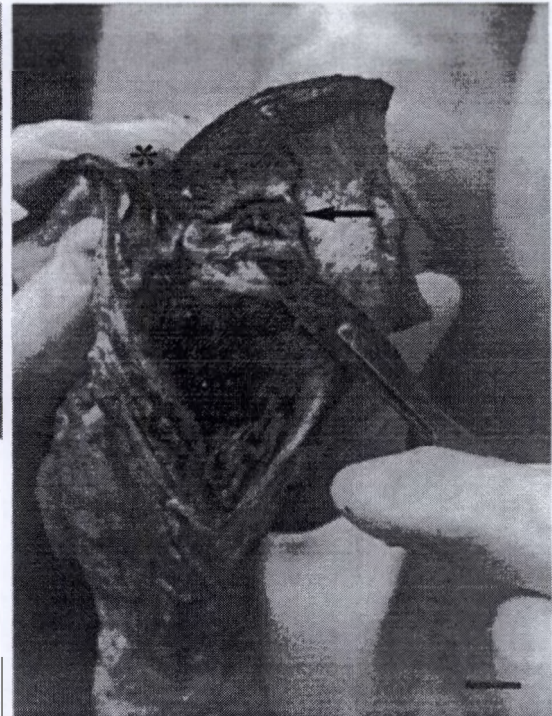


Figure 5: Sperm whale from stranding on Dutch coast showing dissected ear duct demonstrating acute external otitis with large ulcerative areas (arrow) and the external ear duct meatus * . (Bar=1 cm)

Lesions had slightly depressed centers and were limited by a dark gray outline, 2 cm wide. Of one and three sperm whales from the Belgian and Dutch coast respectively, external ear was examined. The ear duct was round to oval, 9 to 11 cm long, about 15 mm in diameter, and contained solid debris resembling skin fragments. Transverse sections of the wall indicated an irregular thickness, 2 to 6 mm, with a red margin in the deeper layer. The duct was covered by corrugated and folded white epithelium. On two animals from the Dutch coast, acute ulcers 1 to 4 cm long were located in the outer third of the external ear duct (Fig. 5).

A longitudinal skin slit, 34 cm long, with slightly raised edges forming labia, was found on the upper left side of the rostrum, left of the blowhole, 35 cm behind the cranial edge of the head of one whale from the Belgian coast. The bottom of the fold communicated with a blind oval duct, 30 cm deep, covered with skin.

White nodules, 1 cm in diameter with a 2 to 3 mm thick wall and yellowish, translucent centers, were found in the blubber of four whales.

Observations of bodily cavities were similar in all animals, principally a generalized visceral passive congestion. Muscle layers of the abdominal wall were evenly dark red to black. Livers were entirely dark red, almost black, with rounded edges. Renal cortices were dark red, medullae were brick-red. The omentum and the serosal surface of the intestine were severely congested, with prominent blood vessels, most segments being evenly brick- to dark red. Gas bubbles were present on the mucosal surface, indicating early putrefaction. Numerous nematodes (*Anisakis* sp.) were observed in the gastric lumen of five animals (Table 3). In two sperm whales, many 2 cm diameter flat hematomas were spread on various segments of the intestinal serosa, bleeding upon incision. In one whale, many white 1 cm diameter nodules were adherent to the serosal surface of various intestinal segments. Gastric and intestinal lumens were almost empty except for few cephalopod beaks between the gastric folds of the sperm whales from Belgium. There was no abdominal fat. Lungs were evenly pinkish red without foam or blood on the cut surface in one sperm whale from Belgium while, in whales from the Netherlands, they were dark red, with bloody fluid oozing from tissue at sectioning. The tongue base was observed in one case (Table 3). In the tonsillar area, near the base of the tongue, the oral mucosa had a purplish-red 2 cm diameter area. Upon sectioning, the oral epithelium invaginated to form a blind duct, 3 cm deep and 1 cm in diameter with congestive wall and several dark red 8 to 10 mm nodules were observed in the wall. At the level of the tonsillar duct opening, 3 round acute 1 cm diameter ulcers were observed.

Microscopically, ulcerative lesions in the mouth were diagnosed as acute to subacute ulcerative stomatitis. Ulcers were deep, exposing dermal connective tissue with hemorrhage, necrosis and edema in the outermost layer and a severe lichenoid infiltrate of neutrophils and lymphocytes was observed. Ulcer edges were sharp. In epidermal layers around ulcers,

spongiosis and ballooning degeneration were observed and formed intraepidermal microvesicles. Some were larger and formed small pustules. In some ballooned cells, weakly Feulgen positive eosinophilic, cytoplasmic inclusion bodies were present. Nuclei were not visible or reduced to small, crescent shape, dense, basophilic remnants. At some distance of the ulcer, similar changes were present, limited to superficial cell layers with mild plasma cells infiltrate at the dermoepidermal junction. Strata germinativum and spinosum formed deep rete ridges in dermis (epidermal hyperplasia) with many mitoses in the basal layer. Acute to subacute perivascular dermatitis was observed around superficial capillaries. The skin ulceration observed on the tail stock of one whale from Belgium was ulcerative subacute dermatitis. A skin erosion on the head of one sperm whale from the Dutch coast was characterized by marked intracellular edema and nucleus displacement of stratum intermedium cells, with some areas of mild acute dermatitis. Ballooning degeneration and eosinophilic intracytoplasmic inclusion bodies also were present. Ear lesions were similar in both groups and were diagnosed as severe diffuse ulcerative subacute to chronic external otitis. Fungi were not detected with PAS stain. The tonsil lesion was diagnosed as an acute tonsillitis, characterized by a massive, diffuse infiltrate of neutrophils and pyknotic cells in tonsillar crypts.

Blubber and subserosal cyst were encapsulated unidentified cestode larvae. In the blubber, they were characterized by an outer cuticle and an inner matrix containing calcareous corpuscles and invaginated scolex, suggesting cysticercus like structure. Postmortem changes in other tissues were severe, precluding any valid microscopic evaluation. Sections of skin, hard palate, tonsil and ear duct were tested for morbillivirus and were all negative.

Skin and hard palate ulcers were examined with electron microscopy. Keratinocytes in basal layers were severely vacuolated, nuclei were large and pale. In more superficial layers, intracellular edema was prominent. In less modified cells, the cytoplasm was rich in polyribosomes. Viral particles were not observed.

Bacteria isolated from intestinal contents were Escherichia coli, Enterobacter aerogenes, Clostridium perfringens, Proteus sp. and Bacillus sp.. From blowhole Escherichia coli were isolated. The external ear duct had Staphylococcus sp. and Clostridium perfringens.

DISCUSSION

Three groups of lesions were identified in the sperm whales stranded on the Belgian and Dutch coasts, first the chronic scars, second the integument ulcers and the poor body condition, and third skin erosions and generalized passive congestion. In the first group were various chronic skin lesions. Round scars were probably impressions made by squid tentacles and longitudinal parallel scars on the head probably were the result of fights between males (Evans, 1993). Both types of lesions are normal findings in adult male sperm whales. The slit

communicating with a blind duct observed on the head of one sperm whale from Belgium was considered to be a vestigial blowhole. Rare cases of sperm whales with 2 distinct blowholes have been reported (Milinkovitch, 1995). These findings had no relation to the stranding.

The second group of lesions included various integument ulcerations. Oral and skin ulcers were suggestive of a viral infection (Yager and Scott, 1993) and electron microscopy investigations revealed that cytoplasm was rich in polyribosomes indicating active protein synthesis. However, no viral particles were seen and a morbillivirus antigen was not demonstrated in tissues using immunoperoxidase. It is likely that postmortem autolysis can prevent detection of antigens and hamper the diagnosis of viral disease such as morbillivirus infection (Lipscomb et al., 1994b; Krafft et al., 1995). More sensitive techniques, such as polymerase chain reaction (PCR), not performed on the tissues, could have been of some help. Ulcerative or erosive stomatitides have been described for beluga whales (Delphinapterus leucas) by De Guise et al. (1995), for distemper-infected Atlantic bottlenose dolphins (Tursiops truncatus) by Lipscomb et al. (1994a) and for distemper-infected striped dolphins (Stenella coeruleoalba) by Domingo et al. (1992, 1995) and Duignan et al. (1992). According to Domingo et al. (1992), these lesions were attributable to secondary opportunistic agents or to infections by calicivirus, herpesvirus or picornavirus. Tonsillitis occurs in various viral infectious diseases (Barker et al., 1993) and in distemper-infected dolphins, morbillivirus antigen has been demonstrated in tonsillar tissue (Domingo et al., 1992). In sperm whales, tonsillar tissue has been described as crypts, located at the base of the tongue (Uys and Best, 1966). Macroscopic and microscopic descriptions of skin erosions and ulcers (sperm whale tail stock from Belgian and one whale head from Dutch coast) are similar to those given for poxvirus and herpesvirus infections in wild cetaceans (Baker, 1992a; 1992b; Baker and Martin, 1992), and for poxvirus infection in domestic animals (Yager and Scott, 1993; Cheville, 1994). Both viral infections occurred in stressed cetaceans, or under poor environmental conditions (Geraci et al., 1979; Martineau et al., 1988).

Ulcerative subacute to chronic external otitis was observed in all the sperm whales we examined. Apparently, similar lesions in cetaceans have not been previously described. Pseudomonas sp. bacteria and Malassezia sp. yeasts are associated with ulcerative chronic otitis in domestic animals (Wilcock, 1993), but bacteria were not isolated and fungi were not seen in surface keratin or in ear canal debris of the stranded sperm whales. The potential extension of such lesions to the middle and inner ear has been reported for domestic animals. In those species, progression through the eighth cranial nerve is frequent and can lead to meningitis and encephalitis (Wilcock, 1993). In cetaceans, lesions in the eighth cranial nerve due to parasitic infection have been suspected to lead to echolocative and vestibular dysfunctions leading to mass strandings (Morimitsu et al., 1986; Morimitsu et al., 1987). Unfortunately, we could not investigate the possible extension of the lesions in the skull of the sperm whales.

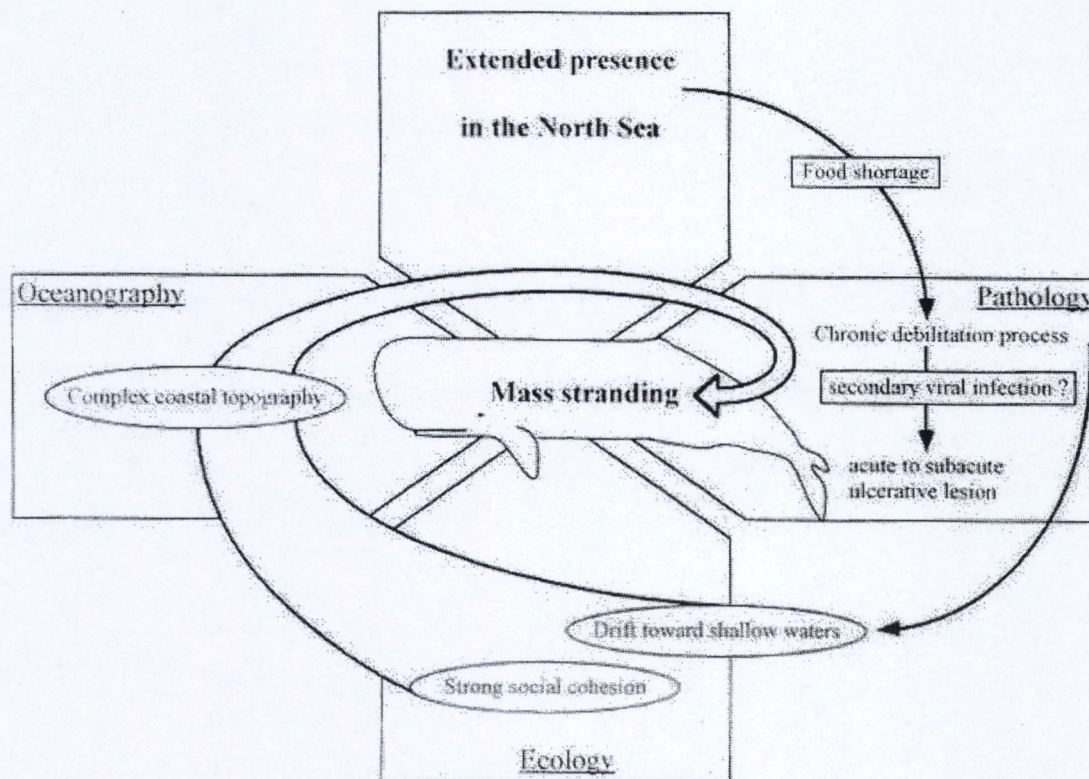


Figure 6: Schematic representation of the hypothesis for the mass strandings of sperm whales on the Belgian and Dutch coasts during winter 1994-95.

In addition to integument lesions, the stranded sperm whales were in poor body condition, as indicated by their low weight, absence of abdominal fat and reduced blubber layers compared with data from healthy animals caught during commercial whaling operations (Lockyer, 1991). In particular, two whales had a severe weight deficit in comparison to their predicted weight. Blubber thickness in the sperm whales from the Dutch coast was lower than values reported by Lockyer (1991) for the same body region (between 15 and 20 cm). Weight loss and blubber thickness reduction suggested a poor nutritional state and a chronic debilitating process. Poor body condition and absence of food in the alimentary tract are frequent findings in stranded cetaceans (Cordes, 1982; Domingo et al., 1992).

This second group of lesions including integument ulcers and poor body condition were present before the strandings and may have played a role in the stranding accidents. It is probable that viral infections, possibly responsible for ulcerative digestive lesions, accelerated the debilitation process. The real importance of those lesions in regard to the strandings is unknown.

The third group of lesions included slightly hemorrhagic skin erosions on the lower abdomen and on the flukes. They were mechanical abrasions due to the rubbing of the animals on the sand during agony. They are frequently reported for stranded whales (Geraci and Lounsbury, 1993; Needham, 1993). Because these lesions were perimortem, it is likely that the sperm whales on the Belgian coast were stranded alive. Similar erosions were not observed on the animal that died at sea.

Visceral passive congestion and disseminated hemorrhages of the intestinal serosa suggested an acute circulatory disturbance as the cause of death, likely shock following cardiovascular failure (Cotran et al., 1994). The shock process is one of the more frequent consequences of marine mammals stranding (Geraci and Lounsbury, 1993; Needham, 1993). Thus, this third group of lesions was probably the direct result of the stranding and indicated the most likely cause of death. The bacteriological and parasitological findings were insignificant.

Finally, our observations on the lesions of stranded whales coupled with an understanding of sperm whale behavior, and of the physical and ecological conditions of the coastal areas involved enabled us to venture an hypothesis on the cause of mass strandings of sperm whales in the southern North Sea (Fig. 6). The animals stranded on the Belgian and Dutch coasts apparently had not fed for a considerable time (empty intestinal tracts, reduction of weight and blubber thickness, absence of abdominal fat). Weight loss and blubber thickness reduction were chronic processes, which had advanced further in the whales stranded on the Dutch coast 2 mo. after those on the Belgian coast. All other lesions were acute to subacute. Possibly, chronic debilitation predisposed these whales to secondary infections.

Sperm whales probably enter the North Sea on their way south from North Atlantic waters. This is consistent with the known distribution area of sperm whale bulls off the coast off Scotland and Norway, and their predominantly southward migration during fall or early winter. It is not known what may cause some sperm whales to take a route too far to the east, which leads them straight into the North Sea. That they may do so, is corroborated by the stomach contents of the two sperm whales stranded November 1994 in the Dutch and German Wadden Sea (Fig. 1). These consisted of large quantities of squid beaks of species occurring in North Atlantic waters, north of the North Sea (Lick et al., 1996; Clarke, in press). Although the northern North Sea is generally > 100 m deep, it becomes progressively shallower further south. The southern part is funnel-shaped and < 40 m deep. The configuration of its coastlines is complex, with numerous sandbanks, estuaries and treacherous differences in tides. This area must be totally unfamiliar to deep-diving oceanic animals like sperm whales. Debilitated animals which have roamed through the North Sea for some time could be particularly prone to confusion and might eventually become grounded or trapped by a falling tide. Social cohesion

would keep the animals together, and a mass stranding could result. Because of its geography and topography, the North Sea is regarded as a potential trap for sperm whales, and weakened animals have very little chance to escape from this "cul-de-sac".

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge T. Jacques, J. Tavernier, the Ceto-Club students and all the people who helped us on the beaches of Koksijde, Nieuwpoort and Scheveningen. The authors thank M. Domingo for providing tissues of morbillivirus-infected dolphin, A. Trudgett for providing the monoclonal antibody to the phocine distemper virus, C. Lockyer for age determination and M. Sarlet, R. Nef, G. Charlier and J-François Bradfer for technical assistance. Thanks also are due to M. García-Hartmann for useful comments on the manuscript. This work was funded by the Impulse Programme in Marine Sciences, supported by the Belgian State - Prime Minister's Service, Office for Scientific, Technical and Cultural Affairs (Contract MS/12/033) and by the European Community (NORSPA 90-1/B/002).

LITERATURE CITED

- BAKER, J. R. 1992a. Skin disease in wild cetaceans from British waters. *Aquatic Mammals* 18: 27-32.
- . 1992b. Causes of mortality and parasites and incidental lesions in dolphins and whales from British waters. *Veterinary Record* 130: 569-572.
- , AND A. R. MARTIN. 1992. Causes of mortality and parasites and incidental lesions in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from British waters. *Veterinary Record* 130: 554-558.
- BANCROFT J. D., AND H. C. COOK. 1996. Proteins and nucleic acids. *In* Theory and practice of histological techniques, J. D. Bancroft and A. Stevens (eds.). Churchill Livingstone, New York, New York, pp.139-150.
- BARKER, I. K., A. A. VAN DREUMEL, AND J. PALMER. 1993. The alimentary system. *In* Pathology of domestic animals, Vol. 2, K. V. F. Jubb, P. C. Kennedy, and N. Palmer (eds.). Academic Press, San Diego, California, pp. 1-318.
- BERROW, S. D., P. G. H. EVANS, AND M. C. SHELDRICK. 1993. An analysis of sperm whale *Physeter macrocephalus* L. stranding and sighting records from Britain and Ireland. *Journal of Zoology* 230: 333-337.
- BEST, P. B. 1979. Social organization in sperm whales, *Physeter macrocephalus*. *In* Behavior of marine animals. Current perspectives in research. Vol. 3: Cetaceans, M. E. Winn and B. L. Olla (eds.). Plenum Press, New York, New York, pp. 227-289.
- CAMPHUYSEN, C. J. 1995. Strandings of Sperm Whales *Physeter macrocephalus* in the NE Atlantic region: a review. Report to the Task Force of the Marine Mammal Action Plan. Camphuysen Seabird Research Consultancy Report 1996-1, Oosterend, Texel, the Netherlands, 48 pp.
- CHEVILLE, N.F. 1994. Ultrastructural pathology: an introduction to interpretation. Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp. 946.

- CLARKE, M. 1997. Cephalopods in the stomach of a sperm whale stranded between the islands of Terschelling and Ameland, southern North Sea. *In* Sperm Whale one year after, scientific symposium on the stranding of sperm whales in the North Sea.
- COCKRILL, W. R. 1960a. Pathology of the cetacea a veterinary study on whales-Part2. *British Veterinary Journal* 116: 179-189.
- . 1960b. Pathology of the cetacea a veterinary study on whales-Part 1. *British Veterinary Journal* 116: 133-144.
- COOK H. C. 1996. Carbohydrates. *In* Theory and practice of histological techniques, J. D. Bancroft and A. Stevens (eds.). Churchill Livingstone, New York, New York, pp.173-211.
- CORDES, D. O. 1982. The causes of whales strandings. *New Zealand Veterinary Journal* 30: 21-24.
- COTRAN, S. R., V. KUMAR, AND S. L. ROBBINS. 1994. Hemodynamic disorders, thrombosis, and shock. *In* Pathologic basis of diseases , R. S. Cotran, V. Kumar, and S. L. Robbins (eds.). W.B. Saunders company, Philadelphia, Pennsylvania, pp. 93-121.
- DE GUISE, S., A. LAGACE, P. BELAND, C. GIRARD, AND R. HIGGINS. 1995. Non-neoplastic lesions in beluga whales (*Delphinapterus leucas*) and other marine mammals from the St Lawrence estuary. *Journal of Comparative Pathology* 112: 257-271.
- DOMINGO, M., J. VISA, M. PUMAROLA, A. J. MARCO, L. FERRER, R. RABANAL, AND S. KENNEDY. 1992. Pathologic and immunocytochemical studies of morbillivirus infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Veterinary Pathology* 29: 1-10.
- , M. VILAFRANCA, J. VISA, N. PRATS, A. TRUDGETT, AND I. K. G. VISSER. 1995. Evidence for chronic morbillivirus infection in the Mediterranean striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*). *Veterinary Microbiology* 44: 229-239.
- DUIGNAN, P., J. R. GERACI, J. A. RAGA, AND N. CALZADA. 1992. Pathology of morbillivirus infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from Valencia and Murcia, Spain. *Canadian Journal of Veterinary Research* 56: 242-248.
- EVANS, P. G. H. 1991. Whales, dolphins and porpoises: order cetacea. *In* The handbook of British mammals, G. B. Corbet and S. Harris (eds.). Blackwell Scientific Publications, Oxford, England, pp. 299-350.
- . 1993. The natural history of whales and dolphins. Academic Press, London, England, 343 pp.
- GERACI, J. R., B. D. HICKS, AND D. J. ST.AUBIN. 1979. Dolphin pox: A skin disease of cetaceans. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 43: 399-404.
- , AND V. J. LOUNSBURY. 1993. Marine mammals ashore a field guide for strandings. Texas A&M Sea Grant publication, Galveston, Texas, 305 pp.
- KENNEDY, S., J. A. SMYTH, P. F. CUSH, M. MCALISKEY, S. J. MCCULLOUGH, AND B. K. RIMA. 1991. Histopathological and immunocytochemical studies of distemper in harbour porpoises. *Veterinary Pathology* 28: 1-7.
- KRAFFT, A., J. H. LICHY, T. P. LIPSCOMB, B. A. KLAUNBERG, S. KENNEDY, AND J. K. TAUBENBERGER. 1995. Postmortem diagnosis of morbillivirus infection in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Atlantic and Gulf of Mexico epizootics by polymerase chain reaction-based assay. *Journal of Wildlife Diseases* 31: 410-415.

- KUIKEN, T., AND M. GARCÍA HARTMANN. 1991. Proceedings of the first European Cetacean Society workshop on Cetacean pathology: dissection techniques and tissue sampling. *European Cetacean Society Newsletter* 17: 1-39.
- LAMBERTSEN, R. H., AND B. A. KOHN. 1987. Unusual multisystemic pathology in a sperm whale bull. *Journal of Wildlife Diseases* 23(3): 510-514.
- , B. A. KOHN, J. P. SUNDBERG, AND C. D. BUERGELT. 1987. Genital papillomatosis in sperm whale bulls. *Journal of Wildlife Diseases* 23: 361-367.
- LICK, R.; B. BANDOMIR-KRISCHAK, M. STEDE, J. WULF, AND H. BENKE. 1996. Case report on two large whales (*Megaptera novaenglia* and *Physeter macrocephalus*) in the German part of the North Sea. *In* *European Research on Cetaceans* vol. 9, P.G.H. Evans, and H. Nice (eds.). Kiel, Germany, pp. 162-163.
- LIPSCOMB, T. P., S. KENNEDY, D. MOFFETT, AND B. K. FORD. 1994a. Morbilliviral disease in an atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) from the Gulf of Mexico. *Journal of Wildlife Diseases* 30: 572-576.
- , F. Y. SCHULMAN, D. MOFFETT, AND S. KENNEDY. 1994b. Morbilliviral disease in Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the 1987-1988 epizootic. *Journal of Wildlife Diseases* 30: 567-571.
- LOCKYER, C. 1991. Body composition of the sperm whales *Physeter macrocephalus*, with special reference to the possible functions of fat depots. *Rit Fiskideilar Journal of the Marine Research Institute Reykjavik* 12: 1-24.
- MARTINEAU, D., A. LAGACE, P. BELAND, R. HIGGINS, D. ARMSTRONG, AND L. R. SHUGART. 1988. Pathology of stranded Beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St Lawrence Estuary, Quebec, Canada. *Journal of Comparative Pathology* 98: 287-311.
- MILINKOVITCH, M. 1995. Molecular phylogeny of cetaceans prompts revision of morphological transformations. *Tree* 10: 328-334.
- MORIMITSU, T., T. NAGAI, M. IDE, A. ISHII, AND M. KOONO. 1986. Parasitic octavus neuropathy as a cause of mass stranding of Odontoceti. *The Journal of Parasitology* 72: 469-472.
- , ———, ———, H. KAWANO, A. NAICHUU, M. KOONO, AND A. ISHII. 1987. Mass stranding of odontoceti caused by parasitogenic eighth cranial neuropathy. *Journal of Wildlife Diseases* 23: 586-590.
- NEEDHAM, D. J. 1993. Cetacean strandings. *In* *Zoo and wild animal medicine current therapy*, M. E. Fowler (ed.). W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 415-425.
- RICE, D. W. 1989. Sperm whale *Physeter macrocephalus* Linnaeus, 1758. *In* *Handbook of marine mammals*, Vol. 4: river dolphins and the larger toothed whales, S. H. Ridgway and R. Sir Harrison (eds.). Academic Press, San Diego, California, pp. 177-233.
- SMEENK, C., AND M. J. ADDINK. 1993. Sighting of a group of sperm whales *physeter macrocephalus* in Dutch waters, with historical notes and the possible Orkney connection. *Lutra* 36: 25-29.
- TRUDGETT, A., C. LYONS, M. J. WELSH, N. DUFFY, S. J. MCCULLOUGH, AND F. MCNEILLY. 1991. Analysis of a seal and a porpoise morbillivirus using monoclonal antibodies. *Veterinary Record* 128: 61.
- UYS, C. J., AND P. B. BEST. 1966. Pathology of lesions observed in whales flensed at Saldanha Bay, South Africa. *Journal of Comparative Pathology* 76: 407-412.

WALSH, M. T., D. K. ODELL, G. YOUNG, E. D. ASPER, AND G. BOSSART. 1990. Mass strandings of cetaceans. *In* Handbook of marine mammal medicine: health, disease, and rehabilitation, L. A. Dierauf (ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 673-683.

WILCOCK, B. P. 1993. The eye and ear. *In* Pathology of domestic animals, Vol. 1, K. V. F. Jubb, P. C. Kennedy, and N. Palmer (eds.). Academic Press, San Diego, California, pp. 441-529.

YAGER, J. A., AND D. W. SCOTT. 1993. The skin and appendages. *In* Pathology of domestic animals, Vol. 1, K. V. F. Jubb, P. C. Kennedy, and N. Palmer (eds.). Academic Press, San Diego, California, pp. 579-592.

10.5. Etude 5 : Pathological findings in two fin whales (*Balaenoptera physalus*) with evidence of morbillivirus infection

T. JAUNIAUX, G. CHARLIER*, M. DESMECHT*, J. HAELTERS†, T. JACQUES†, B. LOSSON‡,
J. VAN GOMPEL♣, J. TAVERNIER§, F. COIGNOUL

Department of Pathology and ‡Laboratory of Parasitology and Parasitic Diseases, Veterinary College, University of Liège, Sart Tilman B43, 4000 Liege, *Veterinary and Agrochemical Research Centre, Groeselenberg 99, 1180 Brussels, †Management Unit of the North Sea Mathematical Models, Royal Belgian Institute of Natural Sciences, Gulledelle 100, 1200 Brussels, and ♣Koninginnelaan, 40, 8370 Blankenberge, §Royal Belgian Institute of Natural Sciences, Vautierstraat 29, 1000 Brussels, Belgium

Journal of Comparative Pathology, 2000, **123**, 198-201

Summary

Two stranded immature female fin whales stranded on Belgian and French coastlines, were examined *post mortem*. The main gross findings were massive parasitic infestation associated with a large thrombus in one whale and severe emaciation. Microscopical investigations revealed multinucleated syncytia with large intranuclear inclusion bodies in various tissues, and positive immunolabelling for morbillivirus antigens. Other evidence of morbillivirus infection was provided by the demonstration of specific viral structures in syncytia and in cell cultures, and the detection of anti-canine distemper virus neutralizing antibodies.

To the authors' knowledge, this is the first firm report of morbillivirus infection in baleen whales.

Morbillivirus infections have been responsible for the death of many thousands of pinnipeds and small cetaceans (Kennedy, 1998). With regard to baleen whales, neutralizing antibodies against dolphin morbillivirus were detected in fin whales (*Balaenoptera physalus*) by Blixenkroner-Møller *et al.* (1996) and lesions of morbillivirus infection were reported in a stranded animal by Jauniaux *et al.* (1998).

Materials and Methods

On 1 November, 1997, a fin whale ("whale 1") was discovered dead at Raversijde (Belgium) and on 9 October, 1998, a further animal of this species ("whale 2") was found on the beach at Wiemereux (France). A complete necropsy was performed on the whale 1 and a partial necropsy on whale 2. Tissue samples for histopathology were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin wax, and sections (5 µm) were stained with haematoxylin and eosin (HE).

All tissues sampled were examined immunocytochemically. A mouse monoclonal antibody (Mab) against a protein fusion of canine distemper virus (CDV) (clone 1C5; Biogenesis, Poole, England) and a further Mab against the glycosylated haemagglutinin protein of phocine distemper virus (PDV; clone 1.3) (Trudgett *et al.*, 1991) were used at a dilution of 1 in 100. The other reagents used were those in the Enhanced Polymer One-Step Staining commercial kit (Dako Envision™; Dako, Glostrup, Denmark). Tissues from healthy and morbillivirus-infected striped dolphins were used as negative and positive controls, respectively. Negative controls in which the primary antibody was omitted, were also included.

Liver and kidney samples were frozen (-80°C) and a direct immunofluorescence technique with anti-CDV polyclonal antibody was applied. A 10% suspension of each positive tissue was prepared and incubated with Vero cell cultures. The latter were regularly checked for the

presence of cytopathogenic changes and the supernates were examined with a transmission electron microscope after negative staining.

Virus neutralization tests with CDV were carried out on serum samples. For transmission electron microscopy (TEM), selected formalin-fixed tissues were transferred to glutaraldehyde 2.5% in phosphate buffer, postfixed with osmium tetroxide, and embedded in epoxy resin.

Intestinal contents and swabs (eye, anus, genital and mammary slits) were collected aseptically and incubated on Columbia Agar with sheep blood 5% (Becton Dickinson Benelux s.a., Belgium) and on Gassner agar for Enterobacteriaceae (Merck, Merck-Belgolabo s.a., Belgium).

Helminths, intestinal contents, liver, lung and kidney were sampled for helminthological examination, renal and pulmonary parenchyma being subjected to preliminary digestion in a solution containing HCl 0,5% and pepsin 1%.

Results

Gross Findings

The carcass of whale 1 (13 m in length) was fresh, but that of whale 2 (12.2 m) was moderately decomposed. Both whales were immature females, aged about 1 year. On the skin of both animals parasitic copepods (Penellidae) and amphipods (Cyamidae) were found. The cephalic region of the copepods was embedded into the blubber layer and surrounded by white fibrous tissue. The nutritional status of the whales 1 and 2 was poor, the thickness of the dorsal blubber layer being only 15 mm and 35 mm respectively. The dorsal muscles were pale, suggesting anaemia, and the subcutaneous tissues were oedematous.

In the abdominal cavity of the whale 1, a chronic thrombus (75 cm in length and 20 cm in diameter) partly obstructing the portal vein was observed. The thrombus was attached caudally to the vessel wall and extended into mesenteric veins. It had a thick (10 to 15 mm) capsule, composed of thin layers of fibrous tissue containing calcified nodules. The thrombus core contained several hundred nematodes embedded in a fibrinous matrix.

A thin (20 mm) layer of gelatinous yellowish oedema was present between the myocardium and the epicardium. There was neither abdominal nor thoracic fat. The gastrointestinal tract was empty.

Necropsy of whale 2 did not include internal examination due to the lack of heavy equipment for carcass disposal.

Histopathological Findings

The mesenteric and mammary lymph nodes of whale 1 contained clusters of multinucleated syncytial cells with occasional large eosinophilic intranuclear inclusion bodies. Some cells contained up to 50 nuclei. Syncytial cells were scattered throughout the mammary lymph nodes whereas in the mesenteric lymph nodes they were present mainly in the cortex. The lymph nodes were severely depleted, with ill-defined, faintly visible lymphoid follicles containing small foci of karyorrhectic lymphoid cells.

The nematodes in the portal vein thrombus were females containing thick-shelled oval eggs at various developmental stages, including larval stages. The parasites could not be identified conclusively, but they probably belonged to the genus *Crassicauda*.

The thrombus capsule was composed of fibrous tissue diffusely infiltrated by lymphocytes, macrophages and eosinophils and nematode eggs at different developmental stages. In the thrombus core, fibrin, lymphocytes, macrophages, eosinophils, necrotic helminth segments, and eggs were present between apparently intact nematodes. Similar parasites were also observed in renal blood vessels associated with a subacute to chronic inflammatory reaction. A similar reaction was seen around the cephalic region of copepods embedded in the blubber layer. In both cases, multinucleated syncytial cells were present. Occasional nematode eggs were observed in lung tissue.

In whale 2, an acute to subacute inflammatory reaction was observed in the subcutaneous tissues adjacent to the cephalic regions of copepods. It was characterised by neutrophils, lymphocytes, many macrophages and small numbers of syncytial cells.

Immunocytochemical Findings

Tissues of whale 1 showed specific intracytoplasmic and intranuclear labelling with anti-CDV and anti-PDV monoclonal antibodies in multinucleated syncytial cells (Fig. 1). In the infected cells of the lymph nodes, immunoperoxidase staining was homogeneous to finely granular in the cytoplasm; nuclear inclusions were homogeneous and more heavily stained. Few mononuclear cells stained positively. Sporadic staining was also observed in syncytia around parasites in the blubber layer and in the kidney.

In the subcutaneous lesions of whale 2, granular intracytoplasmic staining was observed in mononuclear cells with anti-PDV monoclonal antibody. Small numbers of intranuclear inclusion bodies, not detected by HE staining, were heavily labelled.

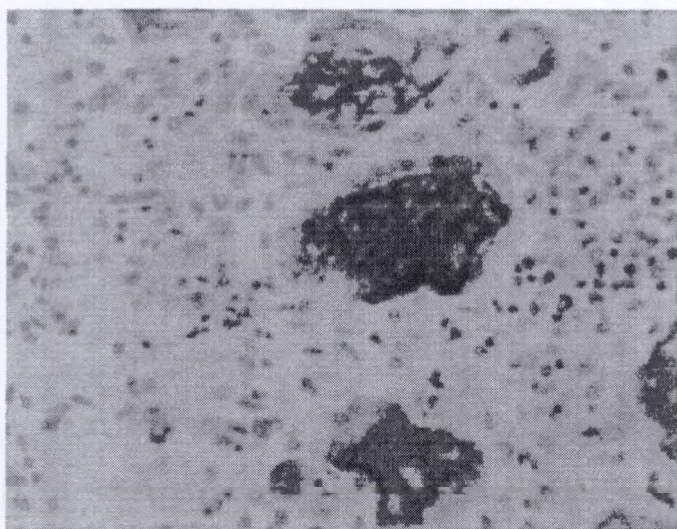


Fig. 1. Medullary zone of a mammary lymph node from whale 1. Immunoperoxidase labelling with a monoclonal antibody against PDV. Note the intracytoplasmic (arrow) and intranuclear (arrowheads) labelling in multinucleated syncytial cells. Bar, 25 μ m

Viral and Other Findings

Heavy immunofluorescence was observed with anti-CDV polyclonal antibody in the liver tissue of whale 1. After eight cell passages, cytopathogenic changes were observed in cell cultures infected with the liver tissue and viral particles (125 nm diameter), typical of paramyxovirus were revealed by negative staining.

CDV neutralizing antibody with titres of 64 and 32 was detected in the serum of the whales 1 and 2, respectively.

Electron microscopical examination of lymphoid tissue revealed intranuclear aggregates of viral nucleocapsids in syncytia.

The only pathogenic bacterium isolated was a *Salmonella* sp., from the intestine of the whale 1.

After pepsin digestion, helminth eggs, similar to those observed in the blood vessels, were obtained from the pulmonary parenchyma.

Discussion

Evidence of morbillivirus infection in the two whales may be summarized as follows. Specific immunolabelling was demonstrated in mononuclear cells of both animals, and in syncytial cells (typical of those associated with morbillivirus) detected in whale 1. This labelling was similar to that observed previously in lymph nodes of morbillivirus-infected dolphins (Domingo *et al.*, 1992; Lipscomb *et al.*, 1994). Serological evidence of infection was also

obtained in both animals. TEM demonstrated large aggregates of viral material (comparable to morbillivirus nucleocapsids) in lymphoid tissue of whale 1, and viral particles, typical of paramyxovirus, were also cultured from the liver of this animal. Examination of whale 2 was hampered by incomplete sampling and partial decomposition.

To the authors' knowledge, this is the first firm report of morbillivirus disease in baleen whales. Neutralizing antibodies against dolphin morbillivirus were previously reported in serum samples of fin whales from Icelandic waters (Blixenkronne-Møller *et al.*, 1996), and anti-CDV antibodies were detected on an adult minke whale *Balaenoptera acutorostrata* from the Mediterranean Sea (Di Guardo *et al.*, 1995); in neither case, however, was further evidence of infection presented.

The lymphoid depletion and the large amount of morbillivirus antigen in lymph nodes suggest that, as in other species (Lipscomb *et al.*, 1994), the disease may be responsible for immunosuppression and secondary infections. This might explain the salmonella infection in whale 1.

The main macroscopical lesion in whale 1 was the chronic thrombus in the portal vein. Similar lesions were reported in cases of *Crassicauda* sp. infestation in fin whales (Lambertsen, 1986). The vascular localization, parasite morphology and lesions suggested that the nematodes belonged to the genus *Crassicauda*. Severe infestations may be lethal, due to congestive renal failure (Lambertsen, 1986).

Both whales were in poor body condition with reduced blubber, absence of abdominal and thoracic fat, and atrophy of dorsal muscles, as compared with healthy animals caught during whaling operations (Lockyer *et al.*, 1985). Subcutaneous and subepicardial oedema, and anaemia -other signs of a poor body condition- may result from: shortage of food, morbillivirus infection, or heavy parasitic infestation.

Since fin whales commonly form small groups of 20 animals or less, an infectious disease is expected to spread slowly in the population. However, in feedings grounds, the groups may reach 100 or more (Gambell, 1985), thus facilitating the spread of infections, as in other cetaceans species (Duignan *et al.*, 1995).

Acknowledgements

The authors acknowledge the Belgian and French authorities, the Centre de Recherche sur les Mammifères Marins (La Rochelle, France) and the numerous volunteers who assisted with the necropsies. They also thank M. Domingo for providing tissue from a morbillivirus-infected dolphin, A. Trudgett for the monoclonal antibody to phocine distemper virus, and A. Villers, M. Sarlet, M.P. Desmecht and F. Verdebout for technical assistance. This work was funded by

the Belgian State, Prime Minister's Service, Office for Scientific, Technical and Cultural Affairs (MN/DD/51).

References

- Blixenkronne-Møller, M., Bolt, G., Dannemann Jensen, T., Harder, T.C. and Svansson, V. (1996). Comparative analysis of the attachment protein gene (H) of dolphin morbillivirus. *Virus Research*, **40**, 47-56.
- Di Guardo, G., Agrimi, U., Morelli, L., Cardeti, G., Terracciano, G. and Kennedy, S. (1995). Post mortem investigations on cetaceans found stranded on the coasts of Italy between 1990 and 1993. *Veterinary Record*, **136**, 439-442.
- Domingo, M., Visa, J., Pumarola, M., Marco, A.J., Ferrer, L., Rabanal, R. and Kennedy, S. (1992). Pathologic and immunocytochemical studies of morbillivirus infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Veterinary Pathology*, **29**, 1-10.
- Duignan, P.J., House, C., Geraci, J.R., Duffy, N., Rima, B.K., Walsh, M.T., Early, G., St.Aubin, D.J., Sadove, S., Koopman, H. and Rhinehart, H. (1995). Morbillivirus infection in cetaceans of the western Atlantic. *Veterinary Microbiology*, **44**, 241-249.
- Gambell, R. (1985). Fin whale *Balaenoptera physalus* (Linnaeus, 1758). In: *Handbook of marine mammals*, vol.3 *The Sirenians and baleen whales*, S.H. Ridgway and R. Harrison Eds, Academic Press, San Diego; 171
- Jauniaux, T., Charlier, G., Desmecht, M., and Coignoul, F. (1998). Lesions of morbillivirus infection in a fin whale (*Balaenoptera physalus*) stranded along the Belgian coast. *Veterinary Record*, **143**, 423-424.
- Kennedy, S. (1998). Morbillivirus infections in aquatic mammals. *Journal of Comparative Pathology*, **119**, 201-225.
- Lambertsen, R.H. (1986). Disease of the common fin whale (*Balaenoptera physalus*): crassicaudiosis of the urinary system. *Journal of Mammalogy*, **67**, 353-366.
- Lipscomb, T.P., Schulman, F.Y., Moffett, D. and Kennedy, S. (1994). Morbilliviral disease in Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the 1987-1988 epizootic. *Journal of Wildlife Diseases*, **30**, 567-571.
- Lockyer, C., McConnell, L.C. and Waters, T.D. (1985). Body condition in terms of anatomical and biochemical assessment of body fat in North Atlantic fin and sei whales. *Canadian Journal of Zoology*, **63**, 2328-2338.
- Trudgett, A., Lyons, C., Welsh, M.J., Duffy, N., McCullough, S.J. and McNeilly, F. (1991). Analysis of a seal and a porpoise morbillivirus using monoclonal antibodies. *Veterinary Record*, **128**, 61.

SUMMARY

Since 1990, the group MARIN (Marine Animals Research & Intervention Network) deals with the scientific multidisciplinary research of marine mammals stranded or by-caught along the Belgian and northern French coasts. Occasionally, MARIN is associated to the necropsy of marine mammals stranded on the Dutch coast.

The aim of the study was to identify lesions and causes of death of small and large cetaceans as well as pinnipeds on the continental coastlines of the southern North Sea. As it is an area submitted to high human pressure, relations between lesions and toxicological data or human activities such as navigation and commercial fishing were investigated. For each animal groups considered (seals, small and large cetaceans), specific theories were built to explain the mechanism of death.

Small cetaceans :

To illustrate lesions and causes of death of small cetaceans, the harbour porpoise was used as model (Study 1). Between 1990 and 2000, 55 porpoises were necropsied. The annual distribution was very irregular with a major rise in 1999. The most common findings were severe emaciation (60 %) with reduction or absence of fat and muscles atrophy; acute bronchopneumonia (49 %); and extended and severe parasitosis (51 %) consisting of heavy parasite infestations of multiple organs with associated lesions. By-catch in fishing nets was considered to be the cause of death of 18 % of porpoises. The gastro-intestinal tract was usually empty, without evidence of recent feeding (83 %).

Neither immunohistochemistry, nor cell cultures revealed evidence of morbillivirus infection or other viral disease. Serology was negative for *Brucella abortus* in all tested porpoises.

Bronchopneumonia was frequently associated with parasitosis or emaciation, or both. These are chronic, debilitating processes which might predispose to fatal bronchopneumonia.

Pinnipeds :

To illustrate lesions and causes of death of pinnipeds, the harbour seal was used as model (Study 2 and study 3). Thirty-four seals were necropsied and the main findings were emaciation, acute broncho-pneumonia and enteritis. Some lesions suggested trauma such as muscle hematomas, multiple ribs fractures, hemothorax and peritonitis associated with gastric perforation by a foreign body. The gastrointestinal tract was always empty, without evidence of recent feeding for most of seals.

Twelve seals were infected by a morbillivirus since the 1998 when unexpected stranding of 16 seals occurred during the summer, in less than one month. Diagnostic was mainly obtained by immunohistochemistry and RT-PCR. By RT-PCR, fragments of the expected size of about 78 base-pair of the phosphoprotein P gene of the morbillivirus were generated from various frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissues.

Two categories of causes of death can easily be identified on well-preserved carcasses: those related to an acute morbid process, usually associated with non-infectious lesions (by-

caught, trauma) and those related to a chronic morbid process, usually associated with infectious lesions. The infectious diseases were frequently associated with morbillivirus infection. Some cases of pneumonia were also related to lung worms infestation. Animals with evidence of infectious diseases were usually emaciated, revealing a long debilitating process. Traumas were related to net entrapment, collision and foreign body ingestion. All those animals were in good nutritional status.

Morbillivirus diseases in seals stranded on the Belgian and northern France coastline since 1998 seems to be the first cases reported in the North Sea since the 1988-1989 outbreak when 18.000 harbour seals died on a population of 25.000.

Large cetaceans

Four sperm whales (Study 4), stranded along the Belgian coast (1994) and three, stranded on the Dutch coast (1995), were necropsied. All were sexually mature males. Significant lesions were ventral skin abrasions, acute skin ulcers, acute ulcerative stomatitides, acute to chronic external otitides, and visceral passive congestion. In addition, sperm whales appeared debilitated (severe weight deficit, blubber thickness reduction, and absence of abdominal fat) and intestinal tracts were almost empty.

Histopathological examinations suggested viral etiology for the integument lesions, but no viral particles were observed by electron microscopy and the presence of morbillivirus antigen was not demonstrated by the immunoperoxidase technique. The poor body conditions and acute integument ulcerative lesions were present before the stranding while ventral skin abrasions and visceral passive congestion were caused by the stranding.

Absence of food in the alimentary tracts, evidence of weight loss and blubber thickness reduction were compatible with an extended presence of the sperm whales in the North Sea, where adequate food is not available. This led to progressive weakness, predisposing the animals to secondary viral diseases. Finally, the coastal configuration of the southern North Sea makes it a trap for sperm whales which have entered the area during their wanderings.

Four fin whales (Study 5) were necropsied, one being stranded on the Belgian coast (1997), two coming ashore in northern part of France (1998; 1999) and one being trapped in a Dutch harbour (2001). All were immature females, aged about 1 year. In 2 cases, necropsy was not performed due to advanced decomposition or lack of heavy equipment to handle carcasses. The 3 stranded whales were emaciated with a reduced blubber layer while the animal trapped in the harbour was in good nutritional status.

Under the microscope, the mesenteric and mammary lymph nodes of the whale stranded on the Belgian coast contained clusters of multinucleated syncytial cells with occasional large eosinophilic intranuclear inclusion bodies. Another whale had an focal acute to subacute inflammatory reactions in the subcutaneous tissues, characterised by neutrophils, lymphocytes, many macrophages and small numbers of syncytial cells. The two whales had evidence of a morbillivirus infection characterized by specific intracytoplasmic and/or intranuclear labelling with anti-CDV and/or anti-PDV monoclonal antibodies in multinucleated syncytial cells and in mononuclear cells. Other evidences of morbillivirus infection were based on RT-PCR (similar than seals), serology, electron microscopy and cell culture.

At the authors' knowledge, it is the first report of specific lesions and antigen presence of morbillivirus infection in a baleen whale and more particularly in fin whale. Such disease could be considered as potential threat on baleen whales, given the frequent association of those viruses with severe epizootics in marine mammals.

Various human activities were associated to the death of marine mammals stranded on the Belgian and northern France coastline. Net entrapment was responsible for the death of porpoises (18 %) and seals (29 %). Other interactions human such as leisure activities were considered as being responsible for additional death of seals (20 %). Finally, one fin whale was trapped in a harbour. Variations of some contaminants concentration were linked to poor nutritional status but it was not clear if lesions were the cause of differences in contaminant concentrations or the opposite, namely contaminants being responsible for the lesions.

Presses de la Faculté de Médecine Vétérinaire
de l'Université de Liège B-4000 Liège Belgique

D/2001/0480/28
ISBN 2-930212-53-5



9 782930 212531