

# Évaluation semi-quantitative des lésions histopathologiques respiratoires chez la dinde moyennant un système de scoring lésionnel: Infection expérimentale par le virus de l'influenza aviaire faiblement pathogène H9N2

Y. BIDOUDAN<sup>1</sup>, S. NASSIK<sup>2</sup>, O. FASSI FIIHRI<sup>2</sup>, E. BOLLO<sup>3</sup>, M. EL HOUADFI<sup>2</sup>, N. TLIGUI<sup>2</sup>

(Reçu le 23/03/2021; Accepté le 27/03/2021)

## Résumé

Dans le cadre de l'étude de la pathogénicité et de l'évaluation de la vaccination du virus de l'Influenza Aviaire faiblement pathogène H9N2 chez la dinde ; une étude histopathologique des lésions engendrées par ce virus suite à l'infection expérimentale de la dinde a été réalisée. Ainsi, 80 dindonneaux ont été mis en essai, et vaccinés contre H9N2 à 8 jours d'âge et le challenge à 26 jours. Un monitoring clinique a été effectué après le challenge, avec la réalisation de deux autopsies à 5 jours et à 10 jours post-challenge. Les dindonneaux ont manifesté des signes respiratoires avec des râles trachéaux, la toux, une sinusite avec des écoulements nasaux et oculaires mousseux, associés à des symptômes généralisés y compris l'entassement, la léthargie et un plumage ébouriffé. Des taux de mortalité de 50 et 20% ont été relevés respectivement chez le groupe de dindonneaux non vaccinés et vaccinés. Sur le plan lésionnel, une sinusite fibrineuse, une trachéite, et une aérosacculite fibrineuse ont été notés chez les deux groupes challengés, à moindre degré chez les vaccinés, avec une pneumonie fibrineuse détectée seulement chez les non vaccinés. L'étude histopathologique a révélé des lésions similaires à la fois chez les groupes vaccinés et non vaccinés à 5 et à 10 jours post-challenge, qui ne diffèrent que par leur gravité. Ainsi un système de scoring de 4 grades (de 0 à 3) a été adopté pour évaluer les lésions trachéales chez les lots d'oiseaux étudiés, la comparaison de ceux-ci s'est basée principalement, sur l'évolution des grades et la précocité de retour à la normale (grade 0). Les lésions ont été plus sévères pendant l'autopsie de 5 JPC, une différence entre les groupes a été relevée, mais aucune différence statistique n'a été démontrée. En conclusion, le système de scoring procure des résultats cohérents ce qui prouve sa fiabilité en tant qu'outil supplémentaire dans les études expérimentales en pathologie aviaire.

**Mots-clés:** Lésions Histopathologiques, scoring lésionnel, dinde, H9N2, infection expérimentale

## Semi-quantitative scoring system for the evaluation of microscopic lesions in the trachea of turkeys following experimental infection with LPAI H9N2

### Abstract

The present study has been designed to contribute both in the evaluation of the pathogenicity of the Moroccan strain of low pathogenic avian influenza virus (LPAI) H9N2 in turkeys and vaccine efficacy against it. For this purpose, clinical monitoring and examination of gross and histopathological lesions following vaccination at 8 days and a challenge at 26 days of age were carried out. The study was conducted on 80 turkeys, which were divided into 4 groups (A: vaccinated and challenged, B: vaccinated and unchallenged, C: unvaccinated and challenged, and D: unvaccinated and unchallenged). Birds were observed daily for 15 days after the challenge for clinical signs. 10 poults from each group were euthanized and autopsied 5 days post-challenge (DPC) and at 10 DPC. Gross lesions were evaluated during necropsy, and trachea samples were collected, and placed in a 10% neutral buffered formalin solution for histopathological examination. All challenged birds exhibited respiratory signs during the observation period which consisted of rales, coughing, sinusitis and ocular and nasal discharges, with lethargy and ruffled feathers. Mortalities of 20 % and 50 % starting 7 DPC were recorded in group A and B respectively. Necropsy revealed fibrinous sinusitis, tracheitis, and fibrinous aerosacculitis in groups A and B with pneumonia only in group B at 5 DPC. Histopathology of the trachea in all the infected birds revealed a lympho-plasmocytic tracheitis with mononuclear cell infiltrates, hyperplasia of epithelial cells, metaplasia, and loss of cilia and mucous glands. Lesions exhibited a varying range of severity depending on days post challenge and groups. Thus a scoring system of 4 grades was created to evaluate and compare groups. Score 0 corresponds to normal tracheal structure, histologic scores of 1 and 2 are characterized mainly by congested blood vessels, depletion of specialized cells, and mononuclear infiltrates, while score 3 corresponds to a histologic pattern of notable thickening of mucosal lining by hyperplasia of epithelial cells, severely congested blood vessels, and metaplasia of surface epithelial cells. Lesions were significantly more severe at 5 DPC, and a visual but non-statistical difference between groups at the same necropsy was noted. The scoring system showed consistent results and helped broaden the perspectives of the present study, and proved to be a reliable tool in the setting of experimental studies in avian pathology.

**Keywords:** Histopathologic lesions, scoring system, Turkey, H9N2, experimental infection

## INTRODUCTION

L'histopathologie a été et est toujours utilisée pour le diagnostic des maladies infectieuses, dégénératives et néoplasiques en médecine humaine et vétérinaire (Klopfleisch, 2013). En outre, cette discipline est largement utilisée dans l'évaluation du pronostic des maladies tumorales. Le principe de cette évaluation repose sur la catégorisation de certaines modifications morphologiques microscopiques ayant des capacités prévisionnelles de l'évolution des néoplasmes. Autrement dit, des indicateurs pronostiques, comme: l'activité mitotique, la nécrose, le polymorphisme

nucléaire et l'invasion vasculaire (Oliveira et Nascimento, 2001). Actuellement le scoring histologique est le moyen le plus pertinent dans l'évaluation du pronostic des sarcomes (Maretty-Nielsen *et al.*, 2014; Oliveira et Nascimento, 2001). Par ailleurs, l'interprétation des lésions histopathologiques et leur scoring est fondamentale dans la caractérisation des dangers et l'évaluation du risque dans le domaine de la pharmacotoxicologie. Le scoring lésionnel est largement utilisé dans les études de toxicité non-clinique pour différencier l'effet du traitement des constatations initiales, ainsi que pour conclure sur l'innocuité et pour déterminer la dose susceptible de produire des effets indésirables des

<sup>1</sup> Cabinet vétérinaire privé, Témara, Maroc

<sup>2</sup> Département de Pathologie et Santé Publique Vétérinaires, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc

<sup>3</sup> Département de sciences vétérinaires, Università degli Studi di Torino, Italie

substances chimiques ou naturelles étudiées (Schafer *et al.*, 2018). Le scoring histopathologique a aussi un potentiel scientifique et pratique non négligeable hors du contexte des néoplasmes et de toxicologie, notamment pour étudier et suivre l'évolution des processus inflammatoires et fibreux, afin d'investiguer et de comparer l'effet des différents traitements appliqués (Cross, 1998). L'évaluation de l'efficacité vaccinale en constitue un bon exemple. En effet, les études de la pathogénicité des agents infectieux aviaires reposent principalement sur les techniques de biologie moléculaire et de sérologie de plus en plus avec des progrès importants réalisés. Un résultat numérique et rapide est assuré, chose qui facilite sa présentation et sa communication aux lecteurs. Alors que l'histopathologie est réservée pour le diagnostic des pathologies engendrant des lésions spécifiques, chose qui est rare en pathologie aviaire. Dans la recherche, une description nominale est généralement attribuée aux lésions, et les prélèvements sont effectués lors d'une seule date. Nous estimons que l'adoption d'un système de scoring lésionnel peut constituer un atout précieux pour les études en pathologie aviaires. Par exemple dans l'étude de la pathogénicité des microorganismes qui affectent la volaille, l'étude de la sensibilité relative des espèces de volaille *vis-à-vis* de ces pathogènes ; ainsi que dans le cadre de l'évaluation de l'innocuité de certaines substances comme les produits alternatifs aux antibiotiques promoteurs de croissance et des nouveaux adjuvants, et plus particulièrement dans l'étude de l'efficacité des vaccins. Le recours à ce système de scoring lésionnel permet également d'évaluer la précocité du retour des tissus et des éléments histologiques étudiés à la normale, ce qui constitue un élément crucial pour juger et comparer les traitements/ lots/ substances étudiées. De plus, la facilité d'interpréter, de comparer, et de communiquer un score ou un grade lésionnel rend l'étude histopathologique plus pratique et plus aisée pour le manipulateur, surtout si le nombre de spécimens traité est élevé ; c'est en effet le cas des études de recherche en pathologie aviaire. La présente étude a été menée pour étudier l'effet pathogène du virus H9N2 chez la dinde et pour évaluer l'efficacité vaccinal contre celui-ci. A cet effet un système de scoring lésionnel a été adopté dans le cadre d'une approche comparative.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Locaux et installations

La forte contagiosité du virus de l'influenza aviaire entre les oiseaux, impose que chaque lot challengé soit séparé de ses homologues expérimentaux non challengés. De ce fait, nous avons disposé d'un bâtiment à l'unité de pathologie aviaire de l'Institut Agronomique et Vétérinaire (IAV) Hassan II pour les lots challengés par le virus H9N2 séparément des lots témoins non challengés, qui eux ont été maintenus dans un autre bâtiment à l'unité de parasitologie et maladies parasitaires. Les deux bâtiments sont éloignés l'un de l'autre d'une distance de plus de 300 mètres. Les oiseaux ont été entretenus par différentes personnes pour éviter la contamination des lots témoins. Des mesures de biosécurité strictes ont été exigées (usage des pédiluves, désinfection des mains, changement de bottes avant chaque franchissement, ...). La qualité de la protection sanitaire est vérifiée par le maintien des lots contrôlés parfaitement indemnes de l'influenza aviaire tout le long de l'expérimentation (preuve sérologique: Bidoudan., 2017).

## Matériel biologique

### Oiseaux

Un nombre de 80 dindonneaux ont été élevés à l'unité de pathologie aviaire à l'IAV Hassan II, celui-ci est reconnu indemne de maladies spécifiques : colibacillose, pullorose, et provient de parentaux vaccinés contre le virus de l'influenza aviaire faiblement pathogène H9N2. Les oiseaux ont reçu l'eau de boisson et l'aliment *ad-libitum* pendant toute la période de l'expérimentation, avec un aliment Commercial adapté à la durée de l'élevage.

### Vaccin

Les oiseaux ont été vaccinés suivant le protocole ci-dessous:

- Vaccination par voie oculaire contre la rhinotrachéite infectieuse de la dinde (TRT) et la maladie de Newcastle (NDV) à un jour d'âge moyennant des vaccins vivants atténués.
- Vaccin inactivé bivalent contenant le virus de l'influenza aviaire faiblement pathogène H9N2 et la souche Ulster 2C du virus de la maladie de Newcastle NDV à 8 jours d'âge par voie intramusculaire.

### Virus

La souche marocaine du virus de l'influenza aviaire faiblement pathogène H9N2 A/chicken /Morocco/SF1/2016 (access number LT598532) utilisée, a été aimablement fournie par la division de la pharmacie et des intrants vétérinaires (DPIV-ONSSA-Maroc). A 26 jours d'âge, chaque oiseau a reçu une dose de 0.2 ml du virus H9N2, à une dose de  $10^7$  EID<sub>50</sub> (Embryo infectious dose). L'inoculation a été effectuée par voie ocularo-nasale par des seringues de 1 ml distribuées sur 5 sujets.

## Protocole expérimental

Afin de mimer les conditions du terrain et potentialiser la manifestation clinique de H9N2 pour enfin arriver à une explication des dégâts rapportés dans le terrain, nous avons adopté le protocole expérimental consigné dans le tableau 1.

### Techniques histologiques

Deux autopsies ont été programmées pour chaque étude, à 5 et à 10 jours post-challenge, pour relever les lésions macroscopiques et prendre des prélèvements pour l'étude histopathologique. Des portions de 5 cm de la trachée ont été prélevées et mises dans une solution de formol 10% neutralisé pour la fixation. La déshydratation est effectuée moyennant des bains d'alcool de concentration croissante (70%, 95%, 100%). L'inclusion est faite à la paraffine et les coupes sont effectuées à 5 microns. Ensuite une coloration classique à l'hématoxyline-éosine (H&E) a été réalisée.

**Tableau 1: Protocole expérimental de l'essai de la dinde**

	A	B	C	D
<b>J1: vaccination contre TRT et NDV</b>	X	X	X	X
<b>J8: vaccination contre H9N2 et rappel contre NDV</b>	X		X	
<b>J26: challenge avec le virus H9N2</b>	X	X		

**Lot A:** vacciné contre H9N2 et challengé, **Lot B:** non vacciné contre H9N2 et challengé, **Lot C:** vacciné contre H9N2 et non challengé, **Lot D:** Non vacciné et non challengé

## Analyses statistiques

Les résultats obtenus ont été traités par le test exact de Fisher en utilisant le logiciel SPSS®

## RÉSULTATS

### Signes cliniques et mortalités

Les dindonneaux âgés de 26 jours, non vaccinés et infectés par voie oculo-nasale par la souche marocaine du virus H9N2 (Lot B), ont montré des signes cliniques à partir du premier jour post-challenge et qui ont persisté jusqu'au 9<sup>ème</sup> jour.

5 dindonneaux ont été trouvés morts au cours de l'essai. Les mortalités ont commencé le 7<sup>ème</sup> JPC avec un pic au cours du 9<sup>ème</sup> JPC, le taux de mortalité enregistré pour ce lot est de 50%. Les signes cliniques manifestés par les dindonneaux consistent en une toux, des éternuements, des râles trachéaux et bronchiques, une léthargie, un entassement des oiseaux et un plumage ébouriffé. En plus des symptômes respiratoires, quelques oiseaux ont présenté une sinusite associée à des écoulements oculaires et nasaux mousseux, entre le 3<sup>ème</sup> et le 8<sup>ème</sup> JPC. Les dindonneaux qui ont été vaccinés contre H9N2 et challengés (Lot A), ont présenté des signes de dépression et des râles trachéaux et bronchiques entre le 3<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> JPC. Ces signes cliniques manifestés par les sujets du lot A sont similaires, mais moins sévères que ceux observés chez le lot B, et se sont également étalés

sur une période plus courte. Le taux de mortalité noté chez ce groupe est de 20% à partir du 7<sup>ème</sup> JPC.

### Lésions macroscopiques

L'examen nécropsique a révélé des lésions limitées à l'appareil respiratoire. Les lésions détectées à 5 jours post-challenge sont plus variées et plus sévères. Les lésions consistent en: une sinusite fibrineuse, une trachéite, une pneumonie fibrineuse, et une aérosacculite fibrineuse. A 10 JPC, le reste des oiseaux ont été sacrifiés et une deuxième autopsie a été réalisée. Les lésions observées sont moins sévères avec seulement des cas de sinusite fibrineuse, aérosacculite fibrineuse et un épaissement des sacs aériens (figure 1). Aucune lésion n'a été relevée chez les oiseaux non challengés euthanasiés (Lots C et D).

### Lésions microscopiques

#### Trachée

Les lésions histopathologiques au niveau de l'épithélium trachéal ont été évaluées, des scores lésionnels en ont été attribués selon les critères suivants:

- Au niveau de l'épithélium: la présence ou l'absence de la ciliature, des cellules calciformes, l'hyperplasie et la métaplasie.
- Au niveau du chorion: l'épaississement, l'œdème, la congestion, l'infiltration lympho-histiocytaire.

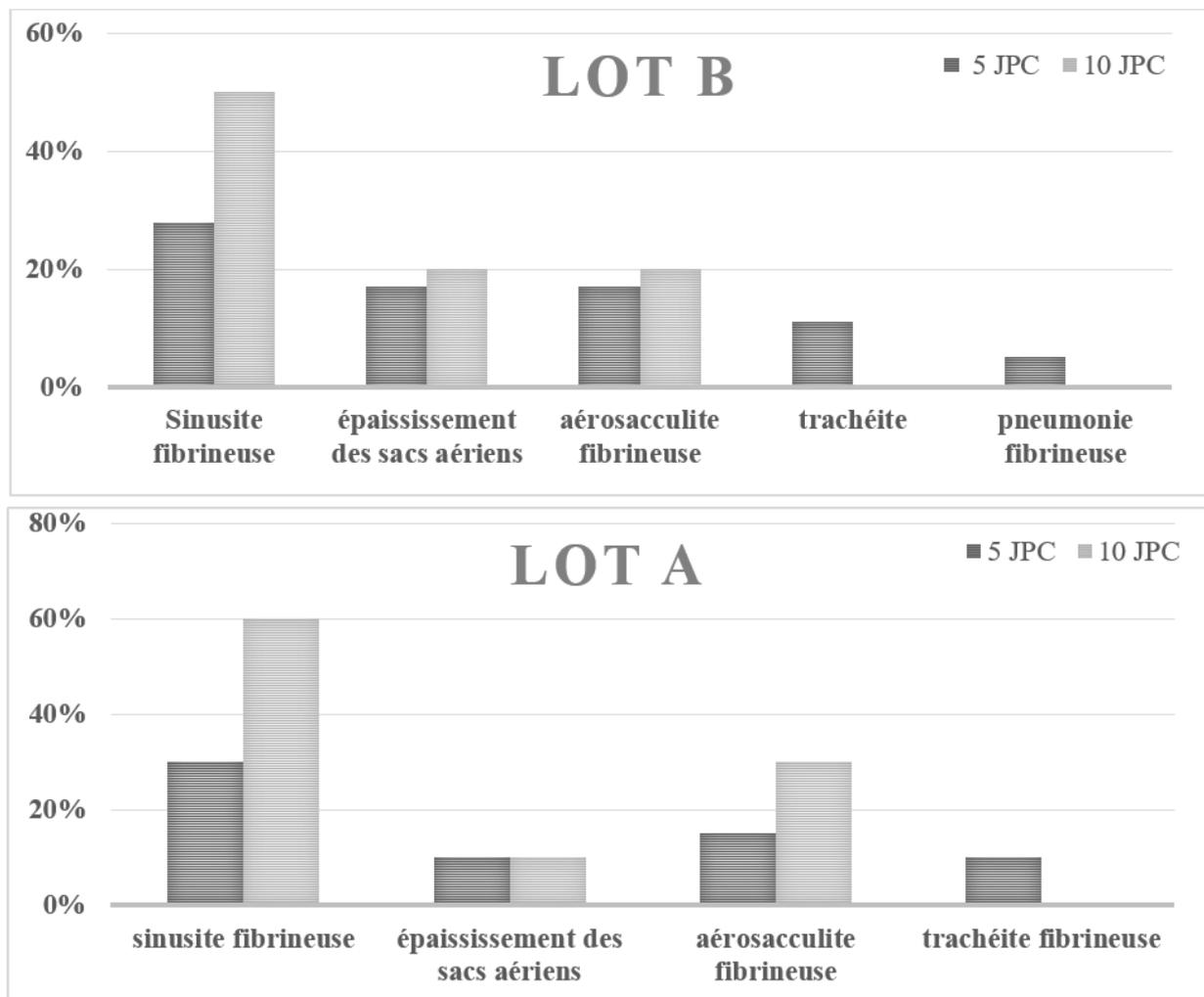
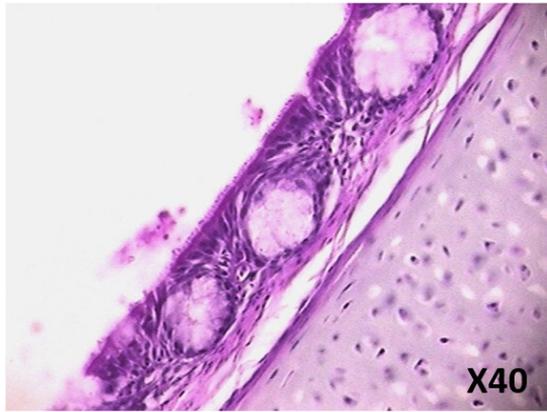


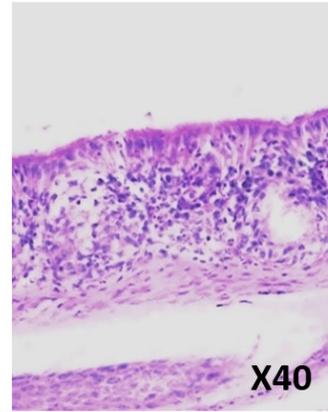
Figure 1: Distribution des lésions macroscopiques chez les dindonneaux du lot A (vacciné et challengé) et du lot B (non vacciné et challengé)

Suivant le système de notation qui suit:

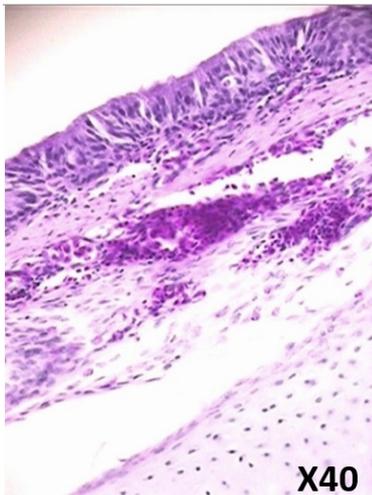
Les résultats du scoring des lésions trachéales, des sujets autopsiés et analysés, sont présentés dans le tableau 3.



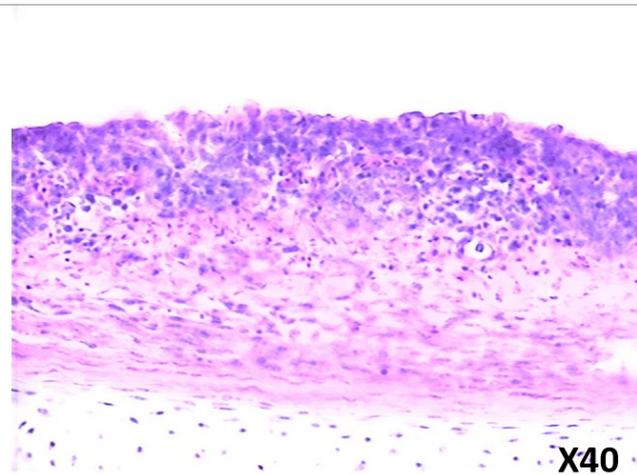
**A: Score 0** Trachée normale Epithélium de type cylindrique, pseudo-stratifié et cilié avec des cellules caliciformes. Le chorion est formé d'un tissu conjonctif lâche. La sous-muqueuse contient des vaisseaux sanguins et un tissu lymphoïde sous forme de lymphocytes dispersés. Le péri-chondre et le cartilage trachéal (H&E)



**B: Score 1** Une Structure épithéliale normale présentant des lésions focales: vaisseaux sanguins hyperémiés; une déciliation focale, une Infiltration lympho-histiocytaire légère, un épaissement de la lamina propria, et une diminution de nombre des cellules caliciformes (H&E)



**C: Score 2** Vaisseaux congestionnés, Infiltration lymphoplasmohistiocytaire diffuse associée à une déciliation importante, raréfaction des cellules caliciformes, un épaissement de la lamina propria, et une hyperplasie épithéliale. (H&E)



**D: Score 3** en plus des lésions précédentes: une métaplasie, absence de glandes et de cellules ciliées (disparition totale des cellules spécialisées de l'épithélium), associée à une hyperplasie épithéliale importante. (H&E)

Figure 2 (A, B, C, D) : Système de scoring des lésions trachéales engendrées par le virus H9N2 chez la dinde (H&E).

Tableau 3: Résultats numériques du scoring des lésions trachéales chez la dinde

	A	B	C	D
5 JPC	3	3	0	--
	3	3	0	--
	3	2	0	--
	3	1	0	--
	3	1	0	--
Score moyen	3	2	0	--
10 JPC	0	0	0	0
	1	0	0	0
	0	0	0	0
	0	-	-	--
	0	-	-	--
Score moyen	0,2	0	0	0

- : Perte de l'échantillon au cours du traitement ou mauvaise qualité de la coupe ne permettant pas d'évaluer les lésions de l'organe.

## DISCUSSION

Le virus de l'influenza aviaire faiblement pathogène H9N2 a été isolé pour la première fois aux États Unis à partir d'un élevage de dinde en 1966 (Homme et Easterday, 1970). Mutinelli *et al.*, (2003) et Alexander (2000) ont remarqué pendant leurs enquêtes épidémiologiques que la sensibilité de la dinde *vis-à-vis* du virus de l'influenza aviaire est accrue, ce qui explique, en effet, les signes cliniques prononcés et le taux de mortalité élevé rapportés lors de cette étude. Les manifestations cliniques ont été variées et se sont aussi étalées sur une grande partie de la période d'observation (les râles, l'œdème facial, l'abattement...). En plus une mortalité de 50 % a été notée chez le lot d'oiseaux non vacciné et challengé et de 20 % chez celui vacciné et challengé. Les lésions macroscopiques sont limitées à l'appareil respiratoire, avec une incidence plus forte chez le lot non vacciné, ces lésions ont été détectées aussi bien à 5 et à 10 JPC. L'étude des lésions histopathologiques de la trachée, en tant qu'organe cible du virus, a révélé une trachéite caractérisée par une déciliation, une raréfaction des cellules caliciformes, une infiltration lympho-plasmohistiocytaire, et une métaplasie malpighienne des cellules épithéliales, relevée avec une variation de la gravité chez tous les lots. Les lésions tendent à être plus graves et plus diffuses chez les individus autopsiés à 5 JPC, à la fois chez les lots vaccinés et non vaccinés. Des résultats similaires ont été rapportés par Stipkovits *et al.* (2012) suite à une étude de co-infection du virus de l'influenza aviaire faiblement pathogène H3N8 et *Mycoplasma gallisepticum*, avec des lésions plus graves chez les oiseaux qui ont été challengés par les deux pathogènes comparativement à ceux challengés par le virus ou le mycoplasme seul. Gharaibeh (2008) et Habl *et al.* (2004) ont aussi rapporté une trachéite lymphocytaire lors de leurs études sur la pathogénicité du virus H9N2. A 10 JPC, les deux lots A et B (vaccinés et non vaccinés) ont montré une récupération totale avec retour à la normale de la structure trachéale. L'étude statistique a montré qu'il n'y a aucune différence significative entre les deux lots challengés, vaccinés ou pas. Afin de pouvoir comparer les lots et conclure sur la capacité du traitement (vaccin dans cette étude) à réduire les lésions «significativement», l'utilisation du système du scoring ne peut pas avoir lieu seule sans paramètres et conditions strictes de standardisation et de réduction des facteurs de variabilité entre les lots (Crissman *et al.*, 2004; Cross, 1998; Gibson-Corley *et al.*, 2013); cela veut dire tous les autres facteurs qui pourraient interférer avec le traitement et causer des changements qui peuvent être interprétés comme étant dus au traitement. Ces facteurs comprennent ceux qui sont liés à l'animal, l'opérateur, le matériel, l'environnement, et puis la méthode. Pour ceux qui sont liés à l'animal, il faut mener l'étude chez des animaux de la même espèce, souche, âge (Burkhardt *et al.*, 2011) et provenant du même lot, puisque la vaccination des parentaux et le taux des anticorps d'origine maternels interfèrent avec la vaccination effectuée avant 10 jours d'âge (De Vriese *et al.*, 2010). En ce qui concerne l'environnement, par exemple, des mauvaises conditions d'entretien, un accès limité à l'eau et un taux élevé d'ammoniac au niveau des locaux d'hébergement, peuvent induire chez un lot d'oiseaux des mortalités accrues et des signes cliniques. A l'autopsie, une hypertrophie rénale et une congestion trachéale plus sévères seraient notées chez ces individus, ce qui va évi-

demment se répercuter sur les conclusions de l'étude. Sur le plan nécropsique, l'autopsie des cadavres d'oiseaux doit obligatoirement être signalée, afin de prendre en considération le biais de l'autolyse *post mortem*. L'endroit de la coupe histologique (la méthode) doit aussi être standardisé, par exemple pour la trachée, le nombre des glandes caliciformes diminue en allant vers la bifurcation trachéale, par conséquent il ne faudrait pas comparer deux sections prises sur deux endroits différents, surtout que la diminution et l'hyperplasie des cellules caliciformes peut se rapporter à une réponse locale au niveau de la trachée (Fletcher, 2008). Il serait également important de s'assurer de la bonne qualité de la fixation et de la coupe de tous les spécimens pour pouvoir les interpréter, leurs attribuer des scores, et finalement les comparer (Gibson-Corley *et al.*, 2013). La lecture des coupes histologiques a été effectuée par un opérateur, de manière anonyme «blinding». Cette méthode est utilisée dans les essais cliniques en médecine humaine pour éviter l'effet placebo chez le patient et le médecin (Day and Altman, 2000; Burkhardt *et al.*, 2011). Parallèlement, dans la recherche, les attentes de l'équipe de l'étude par rapport à un traitement ou un lot pourraient constituer un véritable biais cognitif. La lecture anonyme ou le «blinding/masking» pourrait se faire en histopathologie en désignant une personne externe à l'étude qui attribue des codes pour les groupes, ou simplement en masquant le code des lames et les mélanger avant la lecture. Plusieurs études en pathologie aviaire ont utilisé des systèmes de scoring (Fletcher *et al.*, 1976; Mo *et al.*, 1997; Stipkovits *et al.*, 2012), ce qui témoigne de l'efficacité des scores notamment pour la comparaison et la communication des résultats aux lecteurs; une valeur numérique est attribuée aux modifications cellulaires après l'interprétation des lésions, ce qui facilite la manipulation des données, plus particulièrement pour les statistiques, et la communication de celles-ci. Néanmoins, le scoring lésionnel doit adhérer à un protocole bien établi, qui vise à diminuer les biais de variabilités intra et inter-observateurs, afin d'assurer une bonne reproductibilité du système adopté tels que le fait de standardiser les endroits de prélèvements, la préparation et la lecture des coupes histologiques. Il est aussi préconisé qu'un ou deux autres opérateurs fassent le scoring pour faire des statistiques Kappa et s'assurer de la reproductibilité du système de scoring (Cross, 1996; Furness *et al.*, 2003). Le présent travail de recherche constitue la première étude de pathogénicité du virus de l'IAFP H9N2 chez la dinde au Maroc; l'équipe a pu démontrer la sensibilité accrue de cette espèce *vis-à-vis* de la souche marocaine de l'influenza aviaire H9N2; il a aussi contribué à l'étude de l'évaluation de l'efficacité vaccinale contre ce virus, parmi d'autres techniques. En conclusion, le vaccin a réduit la gravité du tableau clinique et lésionnel, il a aussi réduit le taux de mortalité de 30%, cependant, le scoring lésionnel trachéal n'a pas montré de différences significatives entre les lots d'oiseaux étudiés. Les discordances entre les résultats de l'histopathologie et les lésions macroscopiques peuvent être dues à une insuffisance de l'échantillon, la trachée seule n'est pas représentative de l'état des oiseaux. Une étude histopathologique de l'ensemble des organes atteints (poumons, sacs aériens, sinus) et potentiellement ayant des lésions microscopiques (reins, rate, intestins, foie, et pancréas) est préconisée pour pouvoir conclure sur le plan microscopique.

## RÉFÉRENCES

- Alexander, D.J., (2000). A review of avian influenza in different bird species. *Veterinary microbiology*, 74: 3-13.
- Bidoudan Y., (2017). Étude sérologique, moléculaire et histopathologique de l'influenza aviaire faiblement pathogène à H9N2 chez la dinde et le poulet de chair infectés expérimentalement.
- Burkhardt J.E., Pandher K., Solter P.F., Troth S.P., Boyce R.W., Zabka T.S., Ennulat D. (2011). Recommendations for the evaluation of pathology data in nonclinical safety biomarker qualification studies. *Toxicologic pathology*, 39: 1129-1137.
- Crissman J.W., Goodman D.G., Hildebrandt P.K., Maronpot R.R., Prater D.A., Riley J.H., Seaman W.J., Thake D.C. (2004). Best practices guideline: toxicologic histopathology. *Toxicologic pathology*, 32: 126-131.
- Cross S. (1996). Kappa statistics as indicators of quality assurance in histopathology and cytopathology. *Journal of clinical pathology*, 49:597-599.
- Cross S. (1998). Grading and scoring in histopathology. *Histopathology*, 33:99-106.
- Day S.J., Altman D.G. (2000). Blinding in clinical trials and other studies. *British Medical Journal*, 321: 504.
- De Vriese J., Steensels M., Palya V., Gardin Y., Dorsey K.M., Lambrecht B., Van Borm S., Van Den Berg T. (2010). Passive protection afforded by maternally-derived antibodies in chickens and the antibodies' interference with the protection elicited by avian influenza-inactivated vaccines in progeny. *Avian diseases*, 54:246-252.
- Fletcher O., Anderson D., Kleven S. (1976). Histology of air sac lesions induced in chickens by contact exposure to *Mycoplasma synoviae*. *Veterinary Pathology*, 13: 303-314.
- Fletcher O.J., (2008). Avian histopathology.
- Furness P.N., Taub N., Assmann K.J., Banfi G., Cosyns J.-P., Dorman A.M., Hill C.M., Kapper S.K., Waldherr R., Laurinavicius, A., (2003). International variation in histologic grading is large, and persistent feedback does not improve reproducibility. *The American Journal of Surgical Pathology*, 27:805-810.
- Gharaibeh S., (2008). Pathogenicity of an avian influenza virus serotype H9N2 in chickens. *Avian diseases*, 52:106-110.
- Gibson-Corley K.N., Olivier A.K., Meyerholz D.K. (2013). Principles for valid histopathologic scoring in research. *Veterinary Pathology*, 50: 1007-1015.
- Habl A.M., Sohrabiy H.D.I., Pourbakhsh S., Gholami M., (2004). Histopathological study of intratracheally inoculated A/Chicken/Iran/259/1998 (H9N2) influenza virus in chicken. *Archives of Razi Institute*, 58: 51-62.
- Homme P., Easterday B. (1970). Avian influenza virus infections. I. Characteristics of influenza A/Turkey/Wisconsin/1966 virus. *Avian Diseases*, 66-74.
- Klopffleisch R. (2013). Multiparametric and semiquantitative scoring systems for the evaluation of mouse model histopathology—a systematic review. *BMC Veterinary Research*. 9: 1-15.
- Marett-Nielsen K., Aggerholm-Pedersen N., Safwat A., Jørgensen P.H., Hansen B.H., Baerentzen S., Pedersen A.B., Keller J. (2014). Prognostic factors for local recurrence and mortality in adult soft tissue sarcoma of the extremities and trunk wall: a cohort study of 922 consecutive patients. *Acta Orthopaedica*, 85: 323-332.
- Mo I., Brugh M., Fletcher O., Rowland G., Swayne D. (1997). Comparative pathology of chickens experimentally inoculated with avian influenza viruses of low and high pathogenicity. *Avian Diseases*, 125-136.
- Mutinelli F., Capua I., Terregino C., Cattoli G. (2003). Clinical, gross, and microscopic findings in different avian species naturally infected during the H7N1 low-and high-pathogenicity avian influenza epidemics in Italy during 1999 and 2000. *Avian Diseases*, 47:844-848.
- Oliveira A.M., Nascimento A.G., (2001). Grading in soft tissue tumors: principles and problems. *Keletal Radiology*, 30:543-559.
- Schafer K.A., Eighmy J., Fikes J.D., Halpern, W.G., Hukkanen R.R., Long G.G., Meseck E.K., Patrick D.J., Thibodeau M.S., Wood C.E., (2018). Use of severity grades to characterize histopathologic changes. *Toxicologic Pathology*, 46: 256-265.
- Stipkovits L., Glavits R., Palfi V., Beres A., Egyed L., Denes B., Somogyi M., Szathmary S. (2012). Pathologic lesions caused by coinfection of *Mycoplasma gallisepticum* and H3N8 low pathogenic avian influenza virus in chickens. *Veterinary Pathology*, 49:273-283.