




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

This is an author's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/> 25635

To cite this version:

Maurin, Claire . *Prévalence et diversité des Testudinid herpesvirus et mycoplasmes dans un refuge de tortues*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2019, 82 p.

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

ANNEE 2019 THESE : 2019 – TOU 3 – 4106

PREVALENCE ET DIVERSITE DES *TESTUDINID* *HERPESVIRUS* ET MYCOPLASMES DANS UN REFUGE DE TORTUES

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

Claire MAURIN

Née, le 20 mai 1994 à Avignon (84)

Directeur de thèse : Mr Guillaume LE LOC'H

JURY

PRESIDENT :

Mr Christophe PASQUIER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

Mr Guillaume LE LOC'H
Mr Stéphane BERTAGNOLI

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

MEMBRE INVITE :

Mr Jérôme MARAN

Président de l'Association du Refuge des Tortues

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

Directeur : Professeur Pierre SANS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

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

PROFESSEURS 1° CLASSE

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

PROFESSEURS 2° CLASSE

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

PROFESSEURS CERTIFIÉS DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

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

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

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

Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*

M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*

M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*

M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*

Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*

Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*

Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*

Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*

Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*

M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*

M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*

Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*

Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*

Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*

M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie vétérinaire et comparée*

Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*

Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie - Analgésie*

Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*

Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*

M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*

M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*

Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*

Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*

M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*

Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*

M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales réglementées*

Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT CONTRACTUELS

M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et Industrie des aliments*

M. **LEYNAUD Vincent**, *Médecine interne*

Mme **ROBIN Marie-Claire**, *Ophtalmologie*

Mme **ROMANOS Lola**, *Pathologie des ruminants*

M. **TOUITOU Florian**, *Alimentation animale*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

Mme **BLONDEL Margaux**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie-Imagerie médicale*

M. **COMBARROS-GARCIA Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*

M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*

M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*

M. **LESUEUR Jérémy**, *Gestion de la santé des ruminants – Médecine collective de précision*

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Christophe Pasquier

Professeur des Universités, Doyen de la Faculté des Sciences
Pharmaceutiques de Toulouse

Virologie et Bactériologie

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse.
Remerciements et hommages respectueux.

A Monsieur le Docteur Guillaume Le Loc'h

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Médecine zoologique et de la faune sauvage

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être mon directeur de thèse.
Pour m'avoir proposé ce sujet d'étude et accompagnée pendant sa réalisation.
Toute ma gratitude et mon estime.

A Monsieur le Professeur Stéphane Bertagnoli

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Virologie et infectiologie

Pour m'avoir fait l'honneur d'être assesseur de cette thèse.
Mes remerciements les plus sincères et respectueux.

A Monsieur Jérôme Maran

Président de l'Association du Refuge des Tortues

Pour avoir permis la réalisation de ce projet. Merci pour votre disponibilité.
Toute ma reconnaissance et mon respect.

Table des matières

Table des matières	1
Table des illustrations : Figures	5
Table des illustrations : Tableaux	7
Liste des annexes	8
Liste des abréviations et acronymes utilisés dans le texte	9
Introduction	11
PARTIE 1 : Etude bibliographique des herpesvirus et des mycoplasmes chez les tortues du genre <i>Testudo</i>	13
I. Agents étiologiques	13
1. Les <i>Testudinid herpesvirus</i>	13
a. <i>Taxonomie et nomenclature</i>	13
b. <i>Morphologie et structure</i>	14
c. <i>Propriétés physiques et chimiques</i>	14
d. <i>Pathogénie et modes de transmission</i>	15
2. Les mycoplasmes	16
a. <i>Taxonomie et nomenclature</i>	16
b. <i>Morphologie et structure</i>	16
c. <i>Propriétés physiques et chimiques</i>	17
d. <i>Pathogénie et modes de transmission</i>	17
II. Données épidémiologiques	18
1. Espèces et répartition géographique	18
2. Effet de l'espèce.....	19
3. Prévalences	20
4. Effet de l'âge.....	21
5. Effet du sexe	21
6. Facteurs favorisant la transmission des agents pathogènes	21
III. Présentation clinique	22

1.	Herpesvirose	22
a.	<i>Symptomatologie</i>	22
b.	<i>Tableau lésionnel</i>	26
2.	Mycoplasmosose	27
a.	<i>Symptomatologie</i>	27
b.	<i>Tableau lésionnel</i>	29
IV.	Diagnostic	29
1.	Diagnostic d'une infection par un <i>Testudinid herpesvirus</i>	29
a.	<i>Diagnostic clinique</i>	29
b.	<i>Diagnostic de laboratoire ante mortem</i>	30
i.	Techniques indirectes.....	30
ii.	Techniques directes.....	31
iii.	Autres examens complémentaires	33
c.	<i>Diagnostic expérimental post mortem</i>	34
i.	Examen macroscopique	34
ii.	Examen histopathologique.....	34
iii.	Autres méthodes de diagnostic	34
2.	Diagnostic d'une infection par <i>Mycoplasma agassizii</i>	35
a.	<i>Sérologie ELISA</i>	35
b.	<i>Culture de mycoplasmes</i>	36
c.	<i>PCR</i>	37
d.	<i>Bilan : choix des tests</i>	38
V.	Lutte.....	39
1.	Prise en charge d'un syndrome « rhinite stomatite conjonctivite »	39
a.	<i>Soins de soutien</i>	39
i.	Optimisation de l'environnement	39
ii.	Support nutritionnel	40
iii.	Fluidothérapie.....	41
iv.	Soins locaux.....	41

v.	Nébulisations.....	42
vi.	Analgésie	42
b.	Traitement étiologique	42
i.	Antiviraux	43
ii.	Antibiotiques.....	44
iii.	Antiparasitaires.....	45
c.	Efficacité du traitement	45
2.	Mesures préventives.....	46
a.	Limiter la dissémination de l'infection.....	46
b.	Prévenir l'introduction d'un agent pathogène.....	47
	PARTIE 2 : Etude expérimentale de la prévalence des <i>Testudinid herpesvirus</i>	
	et de <i>Mycoplasma agassizii</i> au sein d'un refuge	48
I.	Matériel et méthodes	48
1.	Lieu et moment de l'étude	48
2.	Récolte des données	49
a.	Population d'étude.....	49
b.	Réalisation des prélèvements	50
c.	Exploitation des échantillons par PCR.....	50
i.	Extraction d'ADN.....	50
ii.	PCR consensus pan-herpesvirus (VanDevanter et al., 1996)	51
iii.	PCR pour la détection de <i>Mycoplasma</i> spp. (Robertson et al., 1993).....	53
iv.	PCR pour la détection de <i>Mycoplasma agassizii</i> (Brown et al., 1995)	53
v.	Electrophorèse.....	54
d.	Séquençage.....	55
i.	Extraction et purification d'ADN	55
ii.	Quantification d'ADN	56
iii.	Envoi séquençage	56
3.	Analyse statistique des données.....	57
II.	Résultats	57

1.	Résultats PCR en fonction de l'espèce de tortue prélevée.....	57
a.	<i>Résultats de la PCR Mycoplasma spp. (Robertson et al., 1993).....</i>	57
b.	<i>Résultats de la PCR Mycoplasma agassizii (Brown et al., 1995).....</i>	58
c.	<i>Comparaison des résultats pour les PCR ciblant Mycoplasma spp. et Mycoplasma agassizii</i>	59
d.	<i>Résultats de la PCR pan-herpesvirus (VanDevanter et al., 1996).....</i>	60
2.	Lien entre le statut clinique et la prévalence.....	60
3.	Prévalence de <i>Mycoplasma agassizii</i> et des <i>Testudinid herpesvirus</i> en fonction de l'enclos de prélèvement.....	62
4.	Corrélation entre les résultats PCR de <i>Mycoplasma agassizii</i> et des <i>Testudinid herpesvirus</i>	65
III.	Discussion	65
1.	Etude comparative de la prévalence dans le refuge	65
2.	Influence de l'espèce de tortue sur la prévalence	67
3.	Corrélation entre l'expression clinique et la présence de l'agent pathogène.....	68
4.	Prévalence en fonction de l'enclos de prélèvement.....	68
5.	Co-infections entre les <i>Testudinid herpesvirus</i> et <i>Mycoplasma agassizii</i>	70
	Conclusion.....	71
	Bibliographie.....	73
	Annexes	81

Table des illustrations : Figures

Figure 1 : Jetage nasal avec formation de bulles au niveau des narines chez une tortue grecque (Chitty, Raftery, 2013b).....	23
Figure 2 : (a) Plaques diphtériques dans la cavité orale d'une tortue du désert et rhinite hémorragique (Origgi, 2006). (b) et (c) Plaques diphtériques dans la cavité orale d'une tortue du désert (Johnson et al., 2005).....	24
Figure 3 : Conjonctivite sévère sur une tortue grecque. La présence d'un exsudat épais rend l'ouverture des paupières impossible (Origgi, 2006).....	25
Figure 4 : Erosion et ulcération de la muqueuse accompagnées d'un œdème intercellulaire. Présence d'inclusions éosinophiliques intranucléaires dans les cellules épithéliales superficielles (flèches) associée à une margination de la chromatine. H&E (x400) (Marenzoni et al., 2018).....	27
Figure 5 : Epistaxis, jetage nasal, epiphora et hyperhémie conjonctivale sur une tortue du désert (Wendland et al., 2006).	28
Figure 6 : Erosion et dépigmentation autour des narines sur une tortue infectée par <i>Mycoplasma agassizii</i> (Wendland et al., 2006).....	28
Figure 7 : Lavage nasal (Wilkinson, 2004).	32
Figure 8 : Mycoplasmes au microscope : exemple de <i>Mycoplasma agalactie</i> . (a) <i>Mycoplasma agalactiae</i> au microscope électronique à transmission illustrant la morphologie et la taille des mycoplasmes (Citti, Blanchard, 2013). (b) Aspect typique des colonies de <i>Mycoplasma</i> en « œuf au plat » sur un support solide après plusieurs jours d'incubation (Citti, Blanchard, 2013).	37
Figure 9 : Photographie de l'enclos n°2 abritant des tortues d'Hermann.....	48
Figure 10 : Plan du refuge comprenant les effectifs de tortues prélevés par enclos.	49
Figure 11 : Prévalence des Testudinid herpesvirus et de <i>Mycoplasma agassizii</i> en fonction de l'espèce de tortue prélevée dans le refuge. Les prévalences ont été calculées en considérant une sensibilité de la PCR de 97% et une spécificité de 98% des PCR. Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95%.....	59
Figure 12 : Distribution des résultats de PCR <i>Mycoplasma agassizii</i> selon le statut clinique.	61
Figure 13 : Distribution des résultats de PCR des Testudinid herpesvirus selon le statut clinique.....	61
Figure 14 : Effectif d'enclos en fonction du taux de positivité de <i>Mycoplasma agassizii</i> dans ceux-ci.	63

Figure 15 : Effectif d'enclos en fonction du taux de positivité des TeHV dans ceux-ci. ..	63
Figure 16 : Carte représentant la prévalence de <i>Mycoplasma agassizii</i> dans les différents enclos testés sur le refuge.....	64
Figure 17 : Carte représentant la prévalence des Testudinid herpesvirus dans les différents enclos testés sur le refuge.....	64

Table des illustrations : Tableaux

Tableau 1 : Amorces utilisées pour la détection des Testudinid herpesvirus par PCR.....	33
Tableau 2 : Effectif de tortues prélevées par espèce.....	50
Tableau 3 : Amorces employées pour la PCR consensus pan-herpesvirus.....	51
Tableau 4 : Composition du mix de la PCR 1 de la PCR consensus pan-herpesvirus avec le KAPA Taq PCR kit, pour 25 µL finaux.....	52
Tableau 5 : Composition du mix de la PCR 2 de la PCR consensus pan-herpesvirus avec le kit KAPA Taq PCR, pour 25 µL finaux.....	52
Tableau 6 : Conditions d'amplification des PCR 1 et 2 de la PCR consensus pan-herpesvirus.....	52
Tableau 7 : Composition du mix de la PCR Mycoplasma spp. avec le kit KAPA Taq PCR, pour 25 µL finaux.....	53
Tableau 8 : Conditions d'amplification de la PCR Mycoplasma spp.....	53
Tableau 9 : Composition du mix de la PCR Mycoplasma agassizii avec le kit KAPA Taq PCR, pour 25 µL finaux.....	54
Tableau 10 : Conditions d'amplification de la PCR Mycoplasma agassizii.....	54
Tableau 11 : Composition du gel d'agarose concentré à 1%.....	55
Tableau 12 : Description des étapes de l'extraction et de la purification d'ADN avec le kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen).....	56
Tableau 13 : Animaux testés et résultats des PCR pour Mycoplasma spp. (Robertson et al., 1993), Mycoplasma agassizii (Brown et al., 1995) et herpesvirus (VanDevanter et al., 1996) triés par espèce.....	58
Tableau 14 : Comparaison des résultats des deux PCR effectuées ciblant les mycoplasmes.....	60
Tableau 15 : Animaux testés et résultats des PCR pour Mycoplasma agassizii et TeHV en fonction de l'enclot de prélèvement.....	62
Tableau 16 : Correspondance des résultats de la PCR ciblant Mycoplasma agassizii et celle ciblant les Testudinid herpesvirus.....	65

Liste des annexes

Annexe 1 : Exemple de résultats positifs obtenus après électrophorèse dans le cas de la détection de *Mycoplasma agassizii* par PCR (Brown et al., 1995). 81

Annexe 2 : Modèle de fiche de prélèvement utilisée dans l'étude. 82

Liste des abréviations et acronymes utilisés dans le texte

°C : degré Celsius

µL : microlitre(s)

µm : micromètre(s)

ADN = DNA : Acide DésoxyriboNucléique = « DeoxyriboNucleic Acid »

AOM : anticorps d'origine maternelle

ASAT : aspartate aminotransférase

dNTP : désoxyribonucléotide triphosphate

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

G : gauges

IM : voie intramusculaire

IV : voie intraveineuse

Ig : immunoglobuline

kb : kilobase(s)

mL : millilitre(s)

NCBI : National Center for Biotechnology Information

ng : nanogramme(s)

nm : nanometre(s)

pb : paire de bases

PBS : "Phosphate buffered saline solution" = Tampon phosphate salin

PCR : "Polymerase chain reaction" = réaction en chaîne par polymérase

PO : voie orale

qPCR : PCR quantitative

RFLP : restriction fragment length polymorphism

RT-PCR : "Reverse transcriptase PCR" = PCR à partir d'ARN

rcf : relative centrifugal force

rpm : revolutions per minute

SC : voie sous-cutanée

SP4® : milieu de culture liquide pour les mycoplasmes

TBE : tris-borate-EDTA

TeHV : Testudinid herpesvirus

TeHV-1 : Testudinid herpesvirus 1

TeHV-2 : Testudinid herpesvirus 2

TeHV-3 : Testudinid herpesvirus 3

TeHV-4 : Testudinid herpesvirus 4

UV-B : ultraviolet B

Introduction

Les chéloniens représentent l'un des groupes d'animaux vertébrés les plus menacés sur terre. On dénombre environ 61% des 356 espèces de tortues connues comme étant menacées ou ayant déjà disparu. Plusieurs facteurs sont responsables de ce déclin comme la destruction des habitats naturels et le changement climatique (Lovich et al., 2018). Le commerce illégal de ces animaux joue également un rôle. De ce fait, de nombreuses espèces de tortues et en particulier celles du genre *Testudo*, sont inscrites à l'annexe II de la Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction (CITES). Elles sont ainsi considérées comme des espèces qui « *bien que n'étant pas nécessairement menacées actuellement d'extinction, pourraient le devenir si le commerce de leurs spécimens n'était pas étroitement contrôlé* » (CITES, 2019). Par ailleurs, l'arrêté du 8 octobre 2018 instaure en France un cadre en fixant les règles générales de détention d'animaux d'espèces non domestiques. Toutefois, d'autres menaces existent, parmi lesquelles les maladies respiratoires mises en cause dans le déclin des populations de tortues terrestres (Soares et al., 2004). Ces affections peuvent être reliées à des causes virales, bactériennes, fongiques et parasitaires mais les deux agents ayant le plus grand impact sur les tortues du genre *Testudo spp.* sont *Mycoplasma agassizii* (Brown et al., 1994 ; 1999) et les *Testudinid herpesvirus* (TeHV) (Marschang, Schneider, 2007). Les présentations cliniques classiques qu'ils engendrent sont assez semblables. Ils sont généralement responsables d'un syndrome rhinite associé à une atteinte oculaire, plus ou moins orale chez de nombreuses espèces de tortues à travers le monde (Kolesnik et al., 2017 ; Salinas et al., 2011). L'identification de l'agent causal est complexe et repose impérativement sur des méthodes de laboratoire (Salinas et al., 2011). Quel que soit le pathogène en cause, il se transmet facilement par les différentes sécrétions (jetage, écoulement oculaire, salive) qui constituent donc des sources d'infection (Muro et al., 1998). Les maladies respiratoires qui en découlent sont ainsi très contagieuses. Le problème est exacerbé dans les refuges ou les collections de tortues dans lesquels la densité de tortues est supérieure à celle du milieu sauvage, puisque la probabilité de contacts entre les individus est augmentée.

Les études épidémiologiques concernant les herpesvirus (TeHV) et les mycoplasmes des chéloniens sont peu nombreuses à l'échelle internationale (McArthur et al., 2002). Par ailleurs, il n'existe à ce jour que deux études estimant la prévalence sur le sol français des deux agents cités précédemment : la première ayant été menée à la fois en France et au Maroc (Mathes et al., 2001) et la seconde ayant établi la prévalence dans toute l'Europe avec uniquement 17 tortues en France sur les 1015 testées (Kolesnik et al., 2017). L'étude présentée ici s'intéresse

à la présence des TeHV et des mycoplasmes (*Mycoplasma agassizii*) dans un refuge de tortues du sud-ouest de la France. Les individus présents ont pour la plupart été abandonnés ou saisis car détenus illégalement. Des animaux nés en captivité sont donc mélangés à des individus issus du milieu naturel. Le projet consiste à détecter l'ADN des deux agents par PCR, à partir de prélèvements réalisés sur un échantillon de 44 tortues du genre *Testudo* réparties dans différents enclos du refuge. Les résultats obtenus permettront ainsi d'estimer la prévalence en herpesvirus et mycoplasmes au sein du refuge, de déterminer si cette prévalence varie en fonction de l'espèce de tortue et de voir si la détection d'un agent est corrélée à l'expression de signes cliniques. Par ailleurs, le projet constitue une étude supplémentaire élargissant les connaissances en termes d'épidémiologie sur les herpesvirus et les mycoplasmes et pouvant être confrontée aux résultats obtenus jusqu'à présent. Enfin, le refuge n'ayant jamais fait l'objet de dépistage, ce projet permettra d'apporter des informations concernant son statut vis-à-vis des deux agents et d'introduire de nouvelles réflexions quant à l'adaptation des mesures de prévention.

PARTIE 1 : Etude bibliographique des herpesvirus et des mycoplasmes chez les tortues du genre *Testudo*

I. Agents étiologiques

1. Les *Testudinid herpesvirus*

a. Taxonomie et nomenclature

Les herpesvirus des chéloniens appartiennent à la famille des *Herpesviridae* faisant elle-même partie de l'ordre des *Herpesvirales*. La famille des *Herpesviridae* comprend des virus de mammifères, d'oiseaux et de reptiles. Elle est divisée en trois sous-familles : les *Alphaherpesvirinae*, les *Betaherpesvirinae* et les *Gammaherpesvirinae*. A ce jour, un faible nombre d'herpesvirus de reptiles ont pu être affectés à une de ces sous-familles (Marschang, 2011). Concernant les TeHV, seul le génotype *TeHV-3* a été identifié comme appartenant au genre *Scutavirus*, dans la sous-famille des *Alphaherpesvirinae* (Marenzoni et al., 2018).

Au sein des herpesvirus de reptiles, ceux des chéloniens sont les plus communs et les mieux caractérisés à ce jour. Chez les tortues terrestres, quatre herpesvirus génétiquement différents ont été décrits et regroupés sous le nom de « *Testudinid herpesvirus* ». Ils ont également été numérotés de un à quatre en fonction de leurs date et lieu de découverte. *TeHV-1* a été isolé et caractérisé en premier en 2001 sur des tortues crêpe (*Malacochersus tornieri*) au Japon. Ce même virus a ensuite été retrouvé en Europe sur des tortues des steppes (*Testudo horsfieldii*) et des tortues crêpe. *TeHV-2* a été isolé en 2005 à la fois sur des tortues du désert (*Gopherus agassizii*) nées en captivité et sauvages. Jusqu'à présent, ce virus n'a été retrouvé qu'aux Etats-Unis. *TeHV-3* est l'herpesvirus le plus répandu en Europe et le mieux caractérisé génétiquement. En effet, un génome complet de cet herpesvirus a été identifié (Origi et al., 2015) et c'est le seul reconnu par l'ICTV (ICTV, 2018). Il a d'abord été isolé sur le pourtour méditerranéen en 2001 chez plusieurs espèces de tortues du genre *Testudo* : la Tortue d'Hermann (*Testudo hermanni*), la Tortue grecque (*Testudo graeca*) et la Tortue des steppes. Plus récemment, ce virus a été détecté chez des tortues bordées (*Testudo marginata*) et des tortues d'Egypte (*Testudo kleinmanni*). Enfin, *TeHV-4* constitue le dernier herpesvirus identifié à ce jour. Il a été isolé en 2010 aux Etats-Unis sur une tortue angulée (*Chersina angulata*) originaire d'Afrique du Sud capturée dans son milieu naturel. Il est impossible de déterminer si l'infection a eu lieu à l'état sauvage en Afrique ou en captivité aux Etats-Unis. C'était l'unique

cas de détection du *TeHV-4* jusqu'en 2016 quand il a été identifié pour la première fois en Europe sur une tortue léopard. *TeHV-1* et *TeHV-3* ayant été les premiers à être isolés, les informations concernant les génotypes plus récemment découverts (*TeHV-2* et *TeHV-4*) sont nettement plus limitées (Origgi, 2012).

b. Morphologie et structure

Les herpesvirus sont des virus de grande taille mesurant 120 à 200 nm de diamètre. Ils ont une forme presque sphérique. Ils possèdent une structure commune avec un ADN double brin linéaire enfermé dans une nucléocapside icosaédrique. L'ensemble est entouré d'un tégment et d'une enveloppe (Pellet, Roizman, 2013 ; Ritchie, 2006).

La réplication virale a lieu dans le noyau de la cellule-hôte. Elle correspond au déroulement général d'un cycle de multiplication chez des virus à ADN. La première phase est celle d'adsorption du virus sur la cellule-hôte. En effet, le virus se fixe au niveau de récepteurs membranaires spécifiques de la cellule. L'enveloppe virale fusionne ensuite avec la membrane cellulaire ce qui laisse pénétrer la nucléocapside dans le cytoplasme. L'ADN est libéré par décapsulation et rejoint le noyau (Pellet, Roizman, 2013).

Le cycle se caractérise par une phase de latence où l'ADN se circularise après son entrée dans le noyau et permet la persistance du virus. La production de nouveaux virions est assurée lors de la phase lytique. L'ADN viral est répliqué indépendamment de la réplication de l'ADN cellulaire. La transcription entraîne la production d'ARN messagers qui sont par la suite traduits en protéines virales. La dernière étape consiste en l'assemblage de nouveaux virions. L'enveloppe du virus est formée à partir du bourgeonnement de l'enveloppe nucléaire. Les nouveaux virus sont alors libérés de la cellule-hôte (Pellet, Roizman, 2013).

c. Propriétés physiques et chimiques

Les herpesvirus étant des virus enveloppés, ils sont relativement fragiles dans le milieu extérieur et sont potentiellement éliminés par différents agents tels que la chaleur et les désinfectants. En effet, ils ne persistent que 22 heures à 37°C et 5 à 10 minutes à 56°C (Ritchie, 2006). Néanmoins, ils peuvent résister 1 à 8 semaines à température ambiante et 9 à 24 semaines lorsqu'ils sont enterrés dans le sol au printemps. Le sol et l'eau constituent ainsi des sources d'infection pour les individus naïfs. La contamination pourrait donc survenir même en l'absence de contact entre une tortue porteuse et une tortue non infectée (Origgi, 2012). Les herpesvirus sont également sensibles aux conditions acides (pH inférieur à 5) (Ritchie, 2006).

d. Pathogénie et modes de transmission

Les herpesvirus ont un spectre d'hôte assez étroit. Ils sont généralement spécifiques d'une espèce hôte chez laquelle ils sont responsables d'une infection subclinique et latente entraînant une atteinte légère. Ils peuvent néanmoins infecter d'autres espèces. N'étant dans ce cas pas adaptés à ces nouveaux hôtes, ils provoquent chez eux une affection beaucoup plus sévère, mettant en danger la vie de l'animal. La sensibilité à un herpesvirus dépend donc à la fois de la souche du virus et de l'espèce hôte (Ritchie, 2006).

Même si l'étendue des informations disponibles sur la pathogénie des TeHV est très pauvre, le mode de transmission semble être majoritairement horizontal, par contact direct d'une tortue porteuse à une tortue saine. Le virus est excrété dans diverses sécrétions en lien avec la localisation des signes cliniques. Ainsi, une tortue présentant une atteinte respiratoire excrète de grandes quantités de particules virales dans les sécrétions nasales et les écoulements oculaires. Au contraire, lors de signes cliniques concentrés sur le tractus digestif et le foie, le virus est susceptible d'être détecté plutôt dans la salive et les fèces. La principale voie d'entrée de l'herpesvirus serait donc les cavités nasales et orale. La transmission verticale semble envisageable chez certaines espèces de tortues car le virus a pu être retrouvé dans l'épithélium testiculaire de plusieurs individus (Ritchie, 2006).

Le temps d'incubation à la suite d'une primo-infection est très variable. Selon les différentes études menées, il pourrait s'écouler de quelques jours à plusieurs mois avant qu'une phase aiguë de l'infection ne soit déclenchée (McArthur et al., 2002). Celle-ci s'accompagne de signes cliniques tels qu'une stomatite, une rhinite et une conjonctivite (Marschang, 2011). La maladie peut ensuite évoluer vers une phase chronique où l'unique signe est souvent une rhinite persistante. Elle peut être aussi associée à des signes plus généraux tels qu'un amaigrissement progressif. L'enchaînement des phases varie d'un individu à l'autre. Certaines tortues présentent une phase aiguë fugace sans être suivie d'une phase chronique. La particularité des herpesvirus est qu'ils sont responsables d'infections latentes définitives et persistent ainsi pendant toute la durée de vie de l'individu infecté. En effet, la diffusion initiale des virions chez l'hôte se déroule par contact direct d'une cellule à l'autre. Ils sont donc protégés des anticorps circulants produits par l'organisme hôte dans le milieu extracellulaire. L'animal ne présente pas en permanence des signes cliniques associés car le virus est présent dans l'organisme sans pouvoir produire de nouveaux virions. La récurrence correspond à une période de synthèse de nouveaux virus et d'excrétion virale temporaire. Elle peut s'accompagner ou non de signes cliniques et survient souvent à la suite de facteurs de stress tels que des changements de température, l'introduction de nouveaux individus, une malnutrition ou encore une maladie

concomitante. Ces facteurs de stress peuvent en effet entraîner une diminution de la quantité d'anticorps produits qui ne sont donc plus assez nombreux pour maintenir le virus en latence. Les lésions associées à une infection par un herpesvirus sont d'ailleurs le plus souvent retrouvées au printemps, ce qui coïncide avec la sortie de brumation, période d'immunodépression (Ritchie, 2006).

Les herpesvirus sont ainsi responsables d'infections dont une résolution clinique est possible. En revanche, l'élimination du virus par l'organisme hôte est illusoire.

2. Les mycoplasmes

a. Taxonomie et nomenclature

Les bactéries du genre *Mycoplasma* appartiennent à la classe des *Mollicutes*, l'ordre des *Mycoplasmatales* et la famille des *Mycoplasmataceae*. Deux agents de mycoplasmoses ont été isolés et caractérisés chez les tortues terrestres : *Mycoplasma agassizii* décrit chez de nombreuses espèces de tortues (Brown et al., 1994) et *Mycoplasma testudineum* découvert plus récemment et génétiquement différent du premier (Brown et al., 1995). *Mycoplasma agassizii* a été isolé en 1994 à la suite d'un déclin des populations de tortues du désert dans le désert de Mojave en Californie provoqué par un syndrome rhinite-conjonctivite (Jacobson et al., 2014). Un lien de causalité a été établi entre l'agent pathogène et la maladie selon les postulats de Koch (Chitty, Raftery, 2013). *Mycoplasma testudineum* a été initialement décrit chez une tortue du désert (*Gopherus agassizii*) aux Etats-Unis en 2004 (Jacobson et al., 2014). De la même façon que pour *Mycoplasma agassizii*, il a été prouvé qu'il était responsable d'une atteinte de l'appareil respiratoire supérieur. Les deux agents pathogènes provoquent des lésions similaires dans les cavités nasales des chéloniens. Cependant, celles engendrées par *Mycoplasma testudineum* semblent être moins sévères et étendues (Jacobson et al., 2012). L'hypothèse d'une moindre pathogénicité de cet agent est envisagée. Un troisième mycoplasme, *Mycoplasma testudinis* a été découvert au Royaume-Uni à partir d'un prélèvement cloacal réalisé chez une tortue grecque (*Testudo graeca*) asymptomatique (Jacobson et al., 2014). C'est en réalité le premier mycoplasme à avoir été isolé chez les chéloniens. Néanmoins, ce dernier n'a pu être relié à aucune pathologie (Bennett, 2011).

b. Morphologie et structure

Les mycoplasmes sont des bactéries irréversiblement dépourvues de paroi cellulaire. Ils ne possèdent donc qu'une membrane qui a la particularité d'être composée en partie de stérols, lui

conférant une certaine rigidité. Du fait de l'absence de paroi, ils ont des formes très variables comme des sphères, des anneaux ou encore des filaments à l'état frais. A la différence des autres bactéries, ils ont une taille très réduite. En effet, ils mesurent de 0,1 à 1 μm de diamètre alors que la plupart des autres bactéries ont des dimensions dix fois supérieures. Ils constituent donc les plus petits organismes vivants capables de se multiplier de façon autonome. En relation avec leur taille, ils possèdent également un génome très réduit qui est à l'origine de capacités limitées en matière de synthèse et ainsi de hautes exigences pour leur culture. En effet, leur croissance requiert la présence de sérum dans le milieu de culture car il contient divers facteurs indispensables, en particulier le cholestérol. Par ailleurs, le milieu doit également satisfaire leurs besoins en acides aminés et vitamines. Lorsqu'ils sont cultivés sur des milieux solides, leurs colonies prennent un aspect typique d'« œuf sur le plat » avec un noyau central surélevé.

c. Propriétés physiques et chimiques

Les mycoplasmes sont généralement peu résistants car ils sont dépourvus de paroi, sauf lorsque le milieu extérieur est humide et riche en protéines. Cependant, ils survivent plusieurs jours au réfrigérateur et plusieurs mois au congélateur à -20°C . Par ailleurs, ils sont sensibles à la lumière, aux rayonnements UV ainsi qu'à la chaleur : une température de 50°C appliquée pendant 10 minutes détruit la moitié des mycoplasmes et une température de 100°C appliquée pendant la même durée en élimine la totalité. Ils sont également peu résistants face à des variations de pH et la plupart des détergents les détruisent. L'absence de paroi favorise enfin leur lyse par choc osmotique. Néanmoins, cette particularité morphologique leur confère des capacités de résistance aux antibiotiques qui ont pour mode d'action d'inhiber la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne ; c'est le cas des bêtalactamines (pénicillines et céphalosporines) et des glycopeptides (vancomycine). Ils sont également résistants aux sulfamides, aux polypeptides (bacitracine, polymyxine B, colistine), à la rifampicine, à l'acide nalidixique et au chloramphénicol. Par conséquent, les familles d'antibiotiques couramment utilisées contre les mycoplasmes sont les tétracyclines, les macrolides et les fluoroquinolones.

d. Pathogénie et modes de transmission

Les différentes espèces de mycoplasmes sont très spécifiques de leur hôte. Ainsi, *Mycoplasma agassizii* n'a été retrouvé que chez certaines espèces de tortues. La transmission de l'agent est horizontale par contact direct entre deux individus (Jacobson et al., 2014). La bactérie colonise alors les surfaces muqueuses ventrolatérales tapissant les cavités nasales (Soares et al., 2004). Cette transmission est plus probable lorsque la tortue infectée présente également des signes cliniques. Mais une tortue porteuse saine est néanmoins capable de transmettre *Mycoplasma* spp. dans certaines conditions adaptées. Une transmission par les

aérosols semble possible mais elle est limitée à des courtes distances. La transmission verticale n'a pas été démontrée à ce jour mais ne peut pas être exclue. De la même manière, les objets et matières inertes contaminés par les mycoplasmes, pourraient être une source de contamination mais aucune preuve n'a été fournie jusqu'à présent. Il a été montré que la probabilité de transmission était directement reliée à la prévalence de la bactérie (Jacobson et al., 2014).

Dans de nombreux cas, les mycoplasmes sont à l'origine d'infections asymptomatiques. Les tortues sont donc souvent porteuses de la bactérie sans que celle-ci ne soit associée à des signes cliniques. L'individu infecté produit alors des anticorps spécifiques mais de manière très variable. En effet, la séroconversion est influencée par les variations saisonnières et d'autres paramètres environnementaux, et peut avoir lieu d'un mois à un an et demi après le contact avec l'agent pathogène (Drake et al., 2019).

Toutefois, une primo-infection par les mycoplasmes peut également entraîner des signes cliniques. La durée d'incubation est généralement de quatre semaines. La présentation clinique peut être aiguë avec une rhinite et une conjonctivite, associées à des écoulements oculaires et nasaux, mais aussi chronique avec des signes de rhinite intermittents (Diemer Berish et al., 2010). La sévérité des symptômes est influencée par l'espèce hôte et son statut immunitaire, la pathogénicité de la souche bactérienne et des facteurs de stress (facteurs environnementaux, affections intercurrentes). Lors de maladie chronique, le système immunitaire de l'hôte est affaibli, ce qui favorise l'entrée d'agents opportunistes. Il n'est pas rare en effet de détecter la présence simultanée de *Mycoplasma agassizii* et d'un herpesvirus lors d'atteinte de l'appareil respiratoire supérieur (Wendland et al., 2006).

Par ailleurs, les anticorps spécifiques produits à la suite d'une infection par *Mycoplasma agassizii* ne semblent pas apporter de protection contre la bactérie. Des études ont montré qu'une exposition antérieure à l'agent pathogène, définie par la production d'anticorps, aggrave les signes cliniques déclenchés lors d'une infection ultérieure (Jacobson et al., 2014).

II. Données épidémiologiques

1. Espèces et répartition géographique

Les TeHV ont été décrits chez de nombreuses espèces de tortues terrestres et sont largement distribués sur l'ensemble du globe. Quatre génotypes ont à ce jour été découverts (Partie I.1). *TeHV-1* a d'abord été isolé au Japon mais est aussi présent en Europe. Il a été décrit chez la Tortue des steppes, la Tortue crêpe et chez les espèces méditerranéennes : la Tortue grecque et

la Tortue d'Hermann (Origgi, 2012). Le *TeHV-3* a été retrouvé chez ces mêmes espèces excepté la Tortue crêpe. D'autres espèces du genre *Testudo* telles que la Tortue bordée et la Tortue d'Égypte peuvent être infectées par le *TeHV-3* (Origgi, 2012 ; Soares et al., 2004). Ce génotype est essentiellement présent en Europe. Enfin, le *TeHV-2* et le *TeHV-4* ont été isolés aux États-Unis, respectivement chez la Tortue du désert (Johnson et al., 2005) et la Tortue angulée (Bicknese et al., 2010). D'autres herpesvirus sont également présents chez des espèces comme la Tortue léopard (*Stigmochelys pardalis*) et la Tortue d'Argentine (*Chelonoidis chilensis*) (Origgi, 2012).

Chez les tortues, les mycoplasmes ont d'abord été identifiés aux États-Unis. Deux agents étiologiques ont été décrits : *Mycoplasma agassizii* et *Mycoplasma testudineum* (Origgi, 2012). Les espèces de tortues les plus touchées sont la Tortue du désert et la Tortue gaufrée (*Gopherus polyphemus*) chez qui les mycoplasmes ont été à l'origine d'un déclin des populations dans les années 1990 (Marschang, 2011). Mais ces mycoplasmes sont également localisés en Europe et sont retrouvés chez des espèces du genre *Testudo* : la Tortue grecque, la Tortue d'Hermann, la Tortue bordée et la Tortue des steppes. Enfin, ils ont été isolés sur des tortues léopards (Jacobson et al., 2014).

2. Effet de l'espèce

Toutes les tortues sont sensibles aux infections par les herpesvirus et constituent des porteurs potentiels de virus latents. Néanmoins, certaines espèces développent des atteintes plus sévères que d'autres, peut-être du fait qu'il existe plusieurs souches du même virus avec des niveaux de virulence différents et qu'une même souche n'a pas le même effet en fonction de l'espèce infectée (McArthur et al., 2002). Par ailleurs, les espèces atteintes varient aussi en fonction du génotype. *TeHV-1* est par exemple majoritairement représenté chez la Tortue des steppes tandis que *TeHV-3* est prédominant chez la Tortue grecque et particulièrement chez la sous-espèce *Testudo graeca iberica* (Marschang, 2011). Plus globalement, les tortues méditerranéennes semblent être majoritairement touchées mais cette information est possiblement biaisée car ce sont les tortues les plus communes au sein des nouveaux animaux de compagnie (Kolesnik et al., 2017). La Tortue d'Hermann et la Tortue des steppes développent généralement les présentations cliniques les plus sévères avec une issue fatale fréquente (McArthur et al., 2002). L'infection se manifeste différemment chez la Tortue grecque et la Tortue bordée. Elles montrent moins de signes cliniques graves et ont un meilleur taux de survie. Il est même possible que certains individus ne développent aucune maladie associée à l'infection virale. C'est particulièrement le cas pour la sous-espèce *Testudo graeca iberica* (McArthur et al., 2002). Ces espèces agissent vraisemblablement comme source

d'infection en étant porteuses asymptomatiques et excrétrices intermittentes du virus (McArthur et al., 2002). Cette moindre sensibilité est en partie due à une plus grande concentration d'anticorps produits (McArthur et al., 2002).

Ces observations sont assez comparables pour les mycoplasmes. La bactérie se retrouve chez de très nombreuses espèces de tortues mais certaines d'entre elles sont plus souvent infectées. C'est le cas pour la Tortue des steppes qui est l'espèce la plus fréquemment porteuse de la bactérie (Jacobson et al., 2014). La Tortue léopard présente également des prévalences d'infection supérieures aux autres espèces. Les tortues originaires d'Europe (*Testudo hermanni*, *Testudo graeca* et *Testudo marginata*) semblent moins sensibles que les tortues africaines (*Stigmochelys pardalis* et *Testudo kleinmanni*) et asiatiques (*Testudo horsfieldii*) (Kolesnik et al., 2017).

3. Prévalences

Les données épidémiologiques concernant la prévalence et l'incidence des TeHV dans les populations captives et sauvages sont très limitées. Seules quelques études ont à ce jour été menées (McArthur et al., 2002). En 2001, une étude menée à la fois en France et au Maroc a montré une prévalence des herpesvirus de 0,3% (Mathes et al., 2001). Au Royaume-Uni, la prévalence des herpesvirus chez les tortues a été estimée à 8,2% à partir d'un échantillon de 146 individus en 2004 (Soares et al., 2004). Une étude plus récente conduite en Espagne a mis en évidence une prévalence de 25% mais celle-ci est possiblement surestimée car les tortues testées présentaient toutes des signes cliniques évocateurs d'une infection par un herpesvirus (Salinas et al., 2011). En 2017, lors d'une enquête épidémiologique sur plus de 800 tortues en Europe, la prévalence a été estimée à 8,0% avec la présence majoritaire de *TeHV-3* (54,3%) et *TeHV-1* (46%) (Kolesnik et al., 2017). Par ailleurs, plusieurs études ont montré que *TeHV-3* était plus fréquemment présent que *TeHV-1*. C'est le cas en 2007 où les prévalences étaient respectivement de 37% et 5,5% (Marschang, Schneider, 2007).

Concernant la prévalence des mycoplasmes et en particulier *Mycoplasma agassizii* et *Mycoplasma testudineum*, les études sont également peu nombreuses. Par ailleurs, les quelques prévalences disponibles sont relativement disparates et ne concernent que *Mycoplasma agassizii* : 2,4% en France et au Maroc (Mathes et al., 2001), 15,8% au Royaume-Uni pour *Mycoplasma agassizii* (Soares et al., 2004), 6% en Espagne (Salinas et al., 2011), 42,2% lors d'une étude européenne (Kolesnik et al., 2017) et 75% aux Etats-Unis (Braun et al., 2014). Ces variations peuvent s'expliquer par les conditions de réalisation des manipulations. Pour certaines études, les tortues sélectionnées étaient symptomatiques d'une atteinte de l'appareil

respiratoire supérieur ou étaient suivies par un vétérinaire alors que pour d'autres protocoles, toutes les tortues d'une même localisation étaient testées arbitrairement, qu'elles soient *a priori* en bonne santé ou atteintes d'une affection respiratoire.

4. Effet de l'âge

Les herpesvirus ont été décrits à la fois chez les jeunes individus et les adultes. Peu d'études concernant l'influence de l'âge sur la probabilité d'infection ont été réalisées. Jusqu'à présent, l'âge ne semble pas agir de façon significative (Soares et al., 2004). Cependant, une étude récente a montré que les adultes étaient significativement plus souvent infectés que les jeunes tortues (Marenzoni et al., 2018).

C'est le même constat dans le cas d'une infection par les mycoplasmes. Les adultes semblent être plus exposés et auraient donc une probabilité augmentée d'être séropositifs (Karlin, 2008 ; Wendland et al., 2010). Une autre étude, au contraire, a montré que les tortues de moins d'un an présentaient une probabilité supérieure à celle des adultes de plus de 40 ans d'être infectées par *Mycoplasma agassizii* (Soares et al., 2004).

Le peu d'études disponibles à ce jour ne permet donc pas de conclure à une réelle influence de l'âge sur la probabilité d'infection par les herpesvirus et les mycoplasmes.

5. Effet du sexe

La plupart des études épidémiologiques concernant les herpesvirus et les mycoplasmes ne démontre pas un rôle significatif du sexe. Néanmoins, il se dégage une tendance pour les mycoplasmes avec un taux de mortalité chez les femelles inférieur à celui des mâles (McCoy, 2008). Cette donnée reste tout de même à confirmer sachant qu'aucun examen post-mortem n'a apporté la preuve de l'implication des mycoplasmes dans les causes de mort (Jacobson et al., 2014).

6. Facteurs favorisant la transmission des agents pathogènes

La transmission d'un herpesvirus est influencée par plusieurs facteurs biologiques et zootechniques. L'espèce de tortue exposée, la souche du virus, l'hygiène du terrarium, l'organisation des enclos sont autant d'éléments qui doivent être pris en compte. En effet, une surpopulation, une mauvaise qualité de l'eau et de l'air ou encore l'accumulation de fèces augmentent la probabilité de transmission en perturbant l'état de santé et l'immunité des individus (Ritchie, 2006).

Certains facteurs favorisent le passage d'une infection latente à une expression clinique de mycoplasmoses. Les perturbations climatiques telles que les périodes de sécheresse augmentent le risque de développement de la maladie et le taux de mortalité (Jacobson et al., 2014). De la même manière, les hivers très froids ont un impact sur le système immunitaire des espèces hôtes au moment de la sortie de brumation, les rendant plus sensibles à une infection par abaissement de la dose infectieuse nécessaire (Sandmeier et al., 2013). Par ailleurs, les activités humaines (agriculture, sylviculture, pollution engendrée...), en participant à la dégradation des habitats des tortues sont à l'origine d'un stress qui favorise le déclenchement de la maladie (Jacobson et al., 2014). Une étude a montré que les tortues éloignées des zones urbaines sont significativement moins infectées que les tortues à proximité des territoires anthropiques (Berry et al., 2006). Enfin, les tortues nées en captivité qui s'échappent ou sont relâchées dans le milieu naturel sont une source majeure de diffusion des mycoplasmes en constituant un réservoir pour les tortues sauvages (Jacobson et al., 2014).

III. Présentation clinique

1. Herpesvirose

a. Symptomatologie

La majorité des informations concernant les infections par les TeHV retrouvée dans la littérature fait référence à des infections par le *TeHV-3* qui touchent principalement les espèces du genre *Testudo* (*Testudo hermanni*, *Testudo graeca*, *Testudo marginata*, *Testudo horsfieldii*) (Origgi, 2012).

La maladie se caractérise surtout par une atteinte des voies respiratoires et digestives supérieures. Le terme de syndrome « stomatite-rhinite-conjonctivite » est d'ailleurs communément employé car il résume les signes cliniques les plus fréquemment rencontrés lors d'une infection par un herpesvirus (Reavill, 2014).

En effet, parmi les signes cliniques majeurs, on retrouve une rhinite souvent associée à un jetage nasal plus ou moins abondant. En début d'infection, le jetage est généralement séreux et filant. Puis plus l'infection progresse, plus les sécrétions s'épaississent et prennent un aspect muqueux à mucopurulent. A ce stade, l'appareil respiratoire profond peut être atteint. Habituellement, le jetage est bilatéral mais un jetage unilatéral ne permet pas d'exclure une infection par un herpesvirus. Il n'est pas rare de voir des bulles se former au niveau des narines (**Figure 1**). Le jetage constitue parfois le seul signe clinique visible de manière chronique chez l'individu infecté. Il est parfois à l'origine d'ulcérations sur les narines. Outre la rhinite, d'autres

étages de l'appareil respiratoire peuvent être touchés : des pharyngites et des trachéites ont déjà été décrites. Enfin, une pneumonie peut se développer occasionnellement (Ritchie, 2006).



Figure 1 : Jetage nasal avec formation de bulles au niveau des narines chez une tortue grecque (Chitty, Raftery, 2013b).

Les signes buccaux tels qu'une stomatite, correspondant à une inflammation de la cavité oro-pharyngée, sont très courants. La stomatite est associée à plusieurs types de lésions : des hémorragies de la muqueuse orale (pétéchies, ecchymoses), des ulcérations ou encore de la nécrose, notamment sur la langue. Il est également fréquent de voir se développer des plaques diphtériques jaunes qui ont l'aspect d'une pseudomembrane relativement friable et caséuse (**Figure 2**) (McArthur, 2004c). Elles se forment sur la muqueuse tapissant l'oropharynx, le nasopharynx et la langue. Elles peuvent même s'étendre jusqu'à la partie crâniale de l'œsophage. Dans de rares cas, elles sont retrouvées dans la trachée et les poumons (Origgi, 2012). Ces plaques apparaissent en général lors de maladie avancée et entraînent d'autres signes cliniques tels qu'une dysphagie voire une anorexie ainsi que du ptyalisme (Mehler, Bennett, 2006). Ces lésions peuvent régresser et réapparaître de manière cyclique (Bennett, 2011). La stomatite peut être aussi associée à une glossite. A cause de cette inflammation majeure de la cavité orale, certaines tortues développent un œdème cervical ventral (Origgi, 2012).

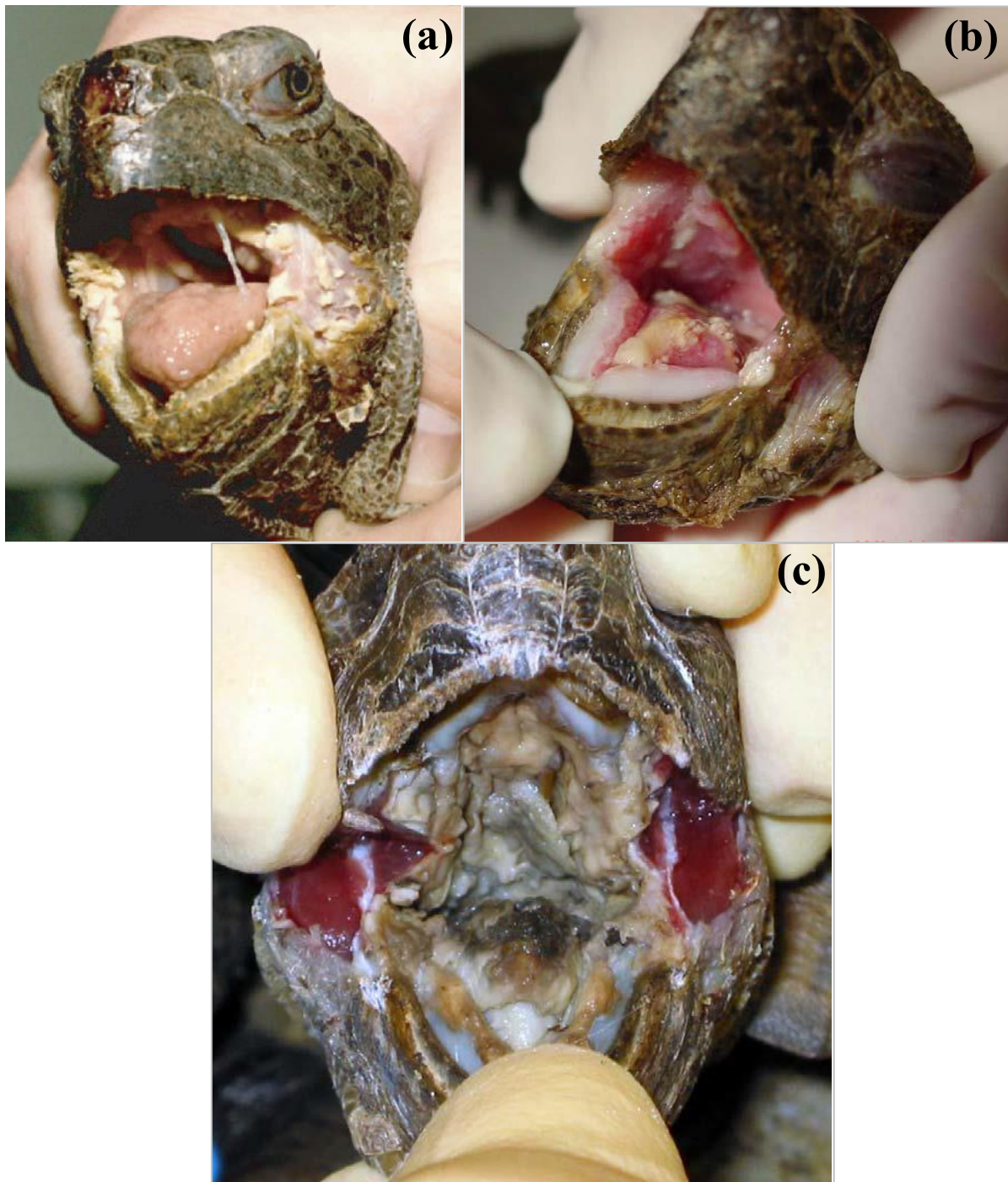


Figure 2 : (a) Plaques diphtériques dans la cavité orale d'une tortue du désert et rhinite hémorragique (Origgi, 2006). (b) et (c) Plaques diphtériques dans la cavité orale d'une tortue du désert (Johnson et al., 2005).

La présentation clinique habituelle est complétée par une conjonctivite (Chitty, Raftery, 2013c). De la même façon que pour la rhinite avec le jetage nasal, des écoulements oculaires sont présents et ont un aspect séreux (epiphora) à mucopurulent (chassie) (**Figure 3**). D'autres signes oculaires peuvent être rencontrés tels qu'une blépharite ou un œdème palpébral (Origgi, 2006). Enfin, une opacité cornéenne transitoire et une procidence de la membrane nictitante ont

été décrites chez une tortue d'Hermann en phase aiguë d'infection par un herpesvirus (Drury et al., 1998).



Figure 3 : Conjonctivite sévère sur une tortue grecque. La présence d'un exsudat épais rend l'ouverture des paupières impossible (Origgi, 2006).

Une dyspnée peut parfois survenir lorsque les lésions de la cavité orale occluent le nasopharynx. Elle est caractérisée par une orthopnée, une respiration bec ouvert ainsi qu'une augmentation de la fréquence respiratoire. La respiration peut devenir bruyante avec des sifflements audibles. Cette détresse respiratoire est souvent associée à des surinfections bactériennes ou fongiques et peut être rapidement fatale (Kolesnik et al., 2017).

Des signes généraux non spécifiques apparaissent souvent secondairement aux signes précédemment cités, lors des phases chroniques d'une infection et lors de co-infections entre des herpesvirus et des mycoplasmes. Les tortues deviennent léthargiques et anorexiques. Un amaigrissement ou une cachexie, associés à une déshydratation sont retrouvés dans de nombreux cas (Marschang, 2011).

Enfin, plus rarement, des signes nerveux apparaissent chez des individus qui ont survécu à une infection aiguë. Ils sont le reflet d'une colonisation du système nerveux central par le virus. Cependant, ces signes cliniques surviennent uniquement lors d'infection active (primo-infection ou récurrence). On rencontre principalement de l'ataxie avec une marche en cercles et un latérocolis. Dans de rares cas, les tortues peuvent présenter une paralysie des membres (Origgi, 2006).

Tous ces signes cliniques peuvent être retrouvés de façon isolée ou combinés. La présentation clinique a tendance à varier en fonction de l'espèce de tortue. Chez la Tortue

grecque par exemple, la stomatite, la rhinite et l'encéphalite constituent les principaux signes alors que la Tortue du désert présente plutôt une atteinte respiratoire avec une trachéite et une pneumonie, associées à une stomatite (Ritchie, 2006). Néanmoins, aucun des signes cliniques décrits ci-dessus n'est spécifique ni pathognomonique d'une infection par un herpesvirus (Origgi, 2012). En effet, d'autres familles de virus sont à l'origine d'une stomatite comme par exemple les ranavirus et les picornavirus (Marschang, 2011). De même, des signes tels qu'un jetage nasal et une conjonctivite peuvent être dus à une mycoplasmosse.

Les infections par des herpesvirus entraînent une forte morbidité et une forte mortalité chez les chéloniens (Origgi, 2006).

b. Tableau lésionnel

Les lésions principales dans le contexte d'une infection par un herpesvirus sont les lésions de stomatite et de glossite. Les plaques diphtériques recouvrant la muqueuse oro-pharyngée et la langue se caractérisent au niveau histologique par de nombreuses cellules épithéliales nécrotiques mêlées à des débris cellulaires, enchâssés dans une épaisse couche de fibrine comprenant un grand nombre d'hétérophiles viables et en cours de dégénérescence (Origgi, 2012).

Dans certains cas, des lésions ulcératives se développent au niveau des muqueuses respiratoire et gastro-intestinale. L'examen post-mortem peut également mettre en évidence des lésions de bronchite, de pneumonie et d'entérite (Ritchie, 2006). Par ailleurs, des cas d'hépatite nécrosante ont été rapportés chez la Tortue d'Hermann, la Tortue des steppes, la Tortue grecque et la Tortue bordée (Hervas et al., 2002).

Enfin, l'histopathologie permet parfois de mettre en évidence des inclusions intranucléaires éosinophiliques ou amphophiliques dans de nombreux tissus différents mais principalement à l'intérieur des cellules épithéliales de la muqueuse orale, de la langue, du tractus respiratoire supérieur et du tractus digestif (***Figure 4***). Plus rarement, les inclusions sont détectées dans le système nerveux, le foie, la rate ou le tractus urinaire (Origgi, 2006). La répartition dans les divers organes est susceptible de varier en fonction de l'espèce de tortue infectée (Origgi, 2012).

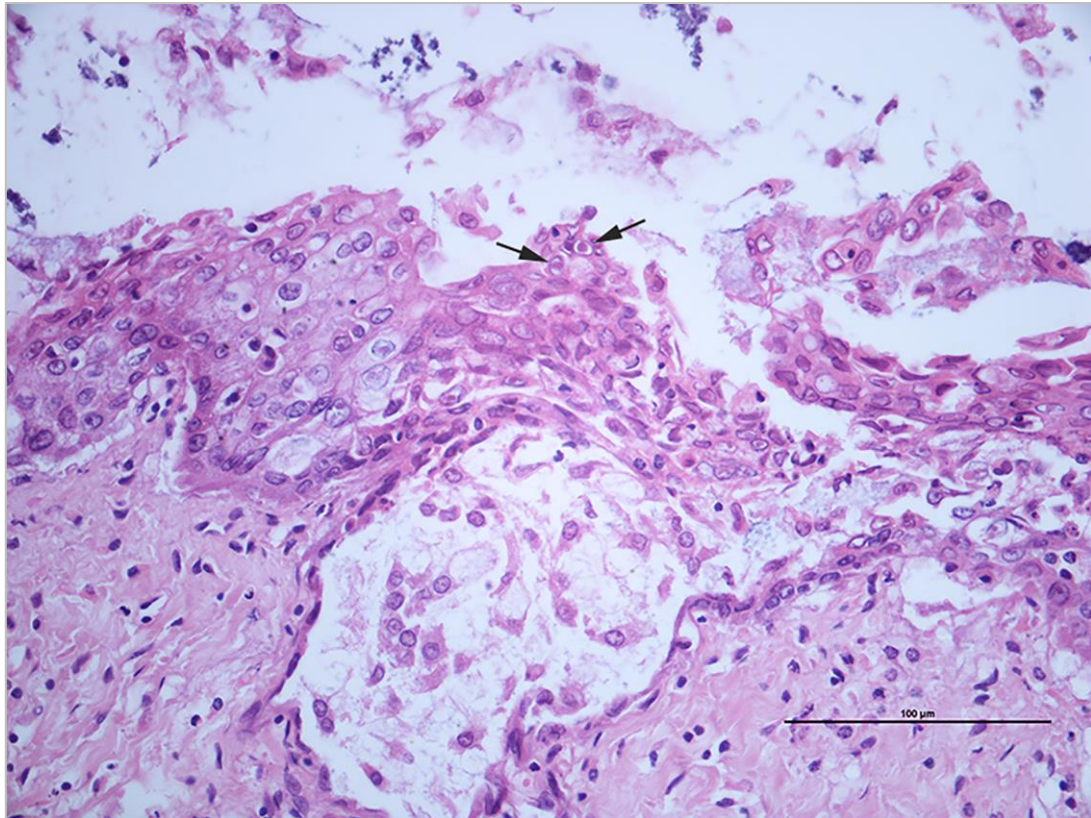


Figure 4 : Erosion et ulcération de la muqueuse accompagnées d'un œdème intercellulaire. Présence d'inclusions éosinophiliques intranucléaires dans les cellules épithéliales superficielles (flèches) associée à une margination de la chromatine. H&E (x400) (Marenzoni et al., 2018).

2. Mycoplasmosse

a. Symptomatologie

Le tableau clinique d'une mycoplasmosse est pratiquement impossible à distinguer de celui d'une herpès-virose, d'autant plus que les deux agents infectieux sont souvent présents simultanément. On parle souvent de « maladie de l'appareil respiratoire supérieur » avec une rhinite associée à un jetage nasal séreux à mucopurulent et une conjonctivite accompagnée d'écoulements oculaires et d'un œdème palpébral (**Figure 5**) (Jacobson et al., 2014). La clinique est parfois aggravée d'une pneumonie. Dans des cas sévères, les narines sont totalement obstruées par un contenu caséux épais et les cavités nasales présentent des ulcérations plus ou moins marquées. Des signes généraux peuvent être présents : baisse d'appétit, léthargie, altération du comportement de fouissage, cachexie (Wendland et al., 2006).



Figure 5 : Epistaxis, jetage nasal, epiphora et hyperhémie conjonctivale sur une tortue du désert (Wendland et al., 2006).

De la même manière que lors d'herpesvirose, une tortue peut présenter un unique signe clinique, ou plusieurs associés. La phase clinique débute en même temps que la réponse immunitaire de l'hôte se met en place lors d'une primo-infection. Il s'ensuit une phase chronique où les signes cliniques et l'excrétion des bactéries surviennent de façon intermittente et où les phases asymptomatiques sont susceptibles de durer des années. En outre, la présentation clinique évolue en fonction de la chronicité de l'infection. Chez les individus ayant subi à plusieurs reprises des phases symptomatiques, il est fréquent de voir apparaître des ulcères en dessous des narines et une dépigmentation autour de celles-ci (**Figure 6**) (Wendland et al., 2006).



Figure 6 : Erosion et dépigmentation autour des narines sur une tortue infectée par *Mycoplasma agassizii* (Wendland et al., 2006).

Il existe également des infections subcliniques pour lesquelles les tortues présentent une sérologie positive mais ne montrent aucun signe clinique. Ces individus constituent une source d'infection (Jacobson et al., 2014).

A la différence des herpesvirus, les mycoplasmes sont associés à une forte morbidité mais une faible mortalité (Wendland et al., 2006).

b. Tableau lésionnel

Dans le cas d'une mycoplasmosse, les lésions de stomatite sont absentes ce qui la distingue d'une infection par un herpesvirus (Soares et al., 2004). Cependant, des lésions situées dans les cavités nasales sont souvent objectivées : des cellules inflammatoires peuvent infiltrer la muqueuse nasale entraînant une destruction de l'épithélium cilié et la formation de multiples agrégats lymphoïdes. Une perte d'architecture de l'épithélium tapissant les cavités nasales est donc évocatrice d'une infection par *Mycoplasma agassizii* chez la tortue. D'un individu à l'autre, l'étendue et la sévérité des lésions peuvent être très différentes (Wendland et al., 2006).

IV. Diagnostic

1. Diagnostic d'une infection par un *Testudinid herpesvirus*

a. Diagnostic clinique

Les signes cliniques détaillés précédemment (stomatite, conjonctivite, rhinite) permettent d'orienter le diagnostic sans pour autant déduire de façon certaine l'implication d'un agent pathogène particulier. En effet, le diagnostic différentiel de chacun de ces signes est large. Les signes oculaires et respiratoires sont notamment présents à la fois lors d'une infection par un herpesvirus et par *Mycoplasma agassizii*. La stomatite et la glossite constituent les seuls signes qui distinguent les deux types d'infections (McArthur et al., 2002). Les tortues présentant une rhinite à mycoplasmes ne semblent pas non plus développer de plaques diphtériques (Origgi, 2012). Néanmoins, l'absence de ce type de lésions n'apporte pas la preuve d'une mycoplasmosse car ces plaques ne seront pas retrouvées systématiquement chez toutes les tortues infectées par un herpesvirus. Leur apparition n'est en effet pas immédiate et dans certains cas, l'évolution de l'infection étant aiguë à suraiguë, la tortue meurt avant de présenter des signes cliniques et des lésions (Origgi, 2012). Par ailleurs, ces plaques ne sont pas spécifiques d'une infection par un herpesvirus. Elles ont également été décrites dans le cas d'infection par un iridovirus (McArthur et al., 2002).

L'examen clinique à lui seul ne permet donc pas d'établir un diagnostic de certitude. En effet, les différents signes cliniques sont peu spécifiques et sont parfois discrets voire absents. Se fonder sur la clinique aboutit uniquement à une suspicion et le diagnostic doit être confirmé ou infirmé à l'aide de méthodes expérimentales.

b. Diagnostic de laboratoire ante mortem

Les TeHV sont probablement les agents pathogènes de tortues pour lesquels il existe la plus large gamme d'examens de laboratoire disponibles (Origgi, 2012). Néanmoins, tous les tests n'apportent pas les mêmes informations. On peut distinguer les méthodes directes qui recherchent l'agent pathogène (antigènes, ADN, particules virales) et les méthodes indirectes qui permettent la détection de la réponse immunitaire de l'hôte face à la présence de cet agent (anticorps). Il est souvent intéressant d'avoir recours aux deux types de méthodes afin d'obtenir l'information la plus complète concernant le statut de l'individu vis-à-vis du pathogène.

i. Techniques indirectes

Les techniques indirectes de diagnostic regroupent notamment les tests sérologiques de recherche d'anticorps. Une sérologie positive apporte la preuve de l'exposition passée ou présente de l'individu au virus. C'est particulièrement important dans le cas des herpesvirus par le caractère latent de l'infection. En effet, lors de latence, l'herpesvirus est difficilement détectable. Au contraire, l'individu devenant la plupart du temps porteur à vie, la détection d'anticorps est relativement fiable (Jacobson, Origgi, 2002).

Cependant, l'inconvénient majeur de la sérologie est qu'il est impossible de savoir si l'individu présente une infection active au moment du prélèvement. En effet, sur un prélèvement unique, la seule conclusion que l'on puisse apporter face à une sérologie positive est que l'individu a déjà été exposé au virus. Pour s'affranchir de ce problème, deux tests peuvent être réalisés à 8-12 semaines d'intervalle (Jacobson, Origgi, 2002). Dans le cas où le taux d'anticorps augmente de façon significative, on peut conclure à une infection active. De la même façon, il n'est pas envisageable d'exclure l'hypothèse d'un herpesvirus sur une sérologie négative. En effet, si le prélèvement est effectué en début d'infection, la séroconversion n'a pas encore eu lieu. Or, dans le cas d'un herpesvirus, elle requiert quatre à neuf semaines. Il est donc toujours préférable de réaliser deux sérologies (McArthur et al., 2002).

La séroneutralisation virale constitue le gold standard pour le diagnostic sérologique d'une exposition à un herpesvirus (Kabisch, Frost, 1994 ; Frost, Schmidt, 1997). Elle recherche la présence d'anticorps neutralisants directement dirigés contre *TeHV-1* et *TeHV-3* dans le sérum (Origgi, 2012). C'est le test sérologique le plus utilisé en Europe. Il présente l'avantage d'être

applicable à toutes les espèces de tortues et d'être largement répandu et disponible dans les laboratoires. Cependant, certaines espèces de tortues (*Testudo hermanni* et *Testudo horsfieldii*) ne semblent pas toujours développer des titres en anticorps neutralisants suffisants (Kabisch, Frost, 1994).

Un test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) est également disponible (Origgi et al., 2001). Il détecte des anticorps anti-TeHV-3 appartenant à la famille des immunoglobulines Y (l'équivalent des IgG des mammifères) à partir de 4-7 semaines post-infection dans le plasma ou le sérum. Cette technique est plus courante aux Etats-Unis (McArthur et al., 2002). Un autre test a été développé pour la détection d'anticorps dirigés contre *TeHV-2* (Jacobson et al., 2012 ; Johnson et al., 2005). L'ELISA est une technique rapide et elle ne nécessite qu'un petit échantillon, autorisant les prélèvements sur des individus de petit gabarit. Mais elle n'a été validée que sur certaines espèces de tortues (*Testudo graeca* et *Testudo hermanni*) (Origgi et al., 2001).

Ces deux méthodes présentent des sensibilités et des spécificités similaires (97% et 98% respectivement) très satisfaisantes (Origgi et al., 2001 ; Origgi, 2012 ; Jacobson, Origgi, 2002). Le test ELISA présente néanmoins l'avantage de pouvoir être effectué deux à cinq semaines plus précocement que la séroneutralisation virale (Origgi et al., 2001). De plus, l'obtention du résultat est nettement plus rapide (1 jour pour l'ELISA, 11 à 14 jours pour la séroneutralisation virale) (Origgi et al., 2001).

ii. Techniques directes

Parmi les techniques directes de diagnostic, l'isolement du virus à partir de cultures cellulaires est celle de référence. En effet, elle constitue la preuve directe d'une infection active. Dans le cas des TeHV, l'écouvillon oro-pharyngé est le type de prélèvement à privilégier. Une fois effectué, il doit être transporté rapidement jusqu'au laboratoire en étant uniquement réfrigéré (McArthur et al., 2002). Les cultures s'effectuent à partir de cellules TH-1 (cellules épithéliales cardiaques de tortues *Terrapene carolina*). La multiplication virale se traduit par un effet cytopathique visible en microscopie optique. Les cellules infectées s'arrondissent et se détachent de leur support dans le milieu de culture (Origgi, 2012). Toutefois, cette méthode est complexe et chronophage. Par ailleurs, elle peut être à l'origine de faux négatifs lorsque la charge virale est insuffisante, ce qui est le cas quand la réplication du virus est inhibée par d'autres agents pathogènes ou encore quand les conditions de transport ne sont pas respectées et entraînent son inactivation (McArthur et al., 2002).

La technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) est largement répandue pour la recherche de virus. A ce jour, plusieurs PCR sont disponibles pour la détection d'ADN des TeHV. Il est en premier lieu possible de réaliser une PCR nichée capable d'amplifier tous les TeHV découverts à ce jour puisqu'elle cible une séquence du gène de l'ADN polymérase très conservée au sein des herpesvirus (VanDevanter et al., 1996). C'est la PCR la plus sensible mais la moins spécifique (Marschang et al., 2006). Une autre PCR a pour cible une séquence partielle du gène UL5, gène également très conservé du complexe hélicase-primase (Teifke et al., 2000). Elle aboutit à la détection de *TeHV-1* et *TeHV-3*. En 2001, une nouvelle PCR semi-nichée amplifiant une séquence partielle du gène de l'ADN polymérase de *TeHV-1* a été développée (Murakami et al., 2001). Les PCR les plus récentes ciblent diverses portions du gène UL39, gène très conservé de la grande sous-unité de la ribonucléotide réductase et permettent la détection de *TeHV-2* et *TeHV-3* (Johnson et al., 2005 ; Origgi et al., 2004) ou uniquement *TeHV-2* en fonction des amorces utilisées (Jacobson et al., 2012). Les diverses PCR évoquées sont répertoriées dans le **Tableau 1**. Les prélèvements traités par PCR sont souvent issus d'écouvillons oro-pharyngés appliqués en particulier à la base de la langue ainsi que de rinçages nasaux (**Figure 7**). La difficulté est d'obtenir un échantillon représentatif contenant l'agent pathogène en quantité suffisante. C'est en général plus aisé sur des prélèvements post-mortem d'organes (langue, œsophage, estomac, intestin, trachée, foie, poumon et cerveau) (McArthur et al., 2002). La PCR est une méthode très souvent utilisée car elle offre une détection sensible de l'ADN d'herpesvirus même lorsque la charge virale est très faible. Par ailleurs, c'est une technique rapide et simple de réalisation (Origgi, 2006). En outre, une RT-PCR a été développée et permet la détection d'ARN messenger correspondant à une portion du gène codant pour la grande sous-unité de la ribonucléotide réductase (Origgi et al., 2004).



Figure 7 : Lavage nasal (Wilkinson, 2004).

L'intérêt dans ce cas est de démontrer que les gènes du virus sont transcrits et donc que l'infection est active.

Une dernière technique de diagnostic direct consiste à colorer à l'hémalum-éosine des écouvillons oro-pharyngés appliqués plus particulièrement sur la langue. Des inclusions intranucléaires peuvent être détectées par microscopie et constituent une preuve fiable d'infection par un herpesvirus (Zangger et al., 1990). Cette méthode a l'avantage d'être rapide et non invasive. Cependant, le risque de faux négatifs est élevé car toutes les tortues infectées ne développent pas ce type d'inclusions. Leur absence ne permet donc pas d'exclure l'hypothèse d'une herpesvirose (Origgi, 2006).

Tableau 1 : Amorces utilisées pour la détection des *Testudinid herpesvirus* par PCR.

Référence	Gène cible	Amorces	Taille de l'amplicon final (pb)	Spécificité
VanDevanter 1996	ADN polymérase	DFA : 5'-GAYT TYGCNAGYYTNTAYCC-3' ILK : 5'-TCCTGGACAAGCAGCARNYS GCNMTNAA-3' KG1 : 5'-GTCTTGCTCACC AGNHCNACNCCYTT-3' TGV : 5'-TGTAACCTCGGTGTAYGGNTTYACNGGNGT-3' IYG : 5'-CACAGAGTCCGTRTCNCCRTADAT-3'	215 – 315	TeHV (tout herpesvirus)
Teifke 2000	Homologue UL5	F2 : 5'-TGGTTGGACAACAACATGGC-3' R2 : 5'-TCATTCCGTTATACATGAGCG-3'	307	TeHV-3 et 1
Murakami 2001	ADN polymérase	U-73 : 5'-AGGCGGGAAAGGATTATGTC-3' L-588 : 5'-AGTTTGATAGGGGATTGAA-3' U-289 : 5'-GATTTACTGGCGTGGCTATG-3'	319	TeHV-1
Origgi 2004 Johnson 2005	Homologue UL39	OS : 5'-TGCACCTTTGATGCGTGGGAT-3' OAS : 5'-TTGATCGTATTCGAATGCCG-3'	386	TeHV-2 et 3
Jacobson 2012	Homologue UL39	5'-GATGCGTGGGATAATGTCCG-3' 5'-TCGGAGGGAATGTCTGGAAAC-3'	334	TeHV-2

iii. Autres examens complémentaires

Du vivant de l'animal, le diagnostic peut être complété par des analyses sanguines. Les travaux du Muro ont montré qu'une infection par un TeHV pourrait être associée à des modifications hématologiques telles qu'une lymphocytose et la présence d'hétérophiles toxiques en quantité importante (Muro et al., 1998). Par ailleurs, des altérations biochimiques constitueraient également des indices d'infection comme l'activité de l'enzyme aspartate aminotransférase (ASAT) et la concentration en alpha-globuline qui seraient significativement augmentées (Muro et al., 1998). Ces éléments sont néanmoins peu spécifiques et ne suffisent pas à confirmer une herpesvirose.

c. Diagnostic expérimental post mortem

i. Examen macroscopique

Le diagnostic post mortem se caractérise tout d'abord par un examen macroscopique des lésions. Dans le contexte d'une infection par un TeHV, les principales lésions à rechercher sont les plaques diphtériques tapissant la cavité orale. En effet, elles sont relativement fréquentes et aisément reconnaissables. La maigreur voire la cachexie peuvent également concorder avec une herpèsvirose mais ne sont pas du tout spécifiques. Ainsi, de la même façon que le diagnostic clinique, l'examen macroscopique est insuffisant pour établir un diagnostic avec certitude (McArthur et al., 2002).

ii. Examen histopathologique

L'examen histopathologique peut s'avérer très informatif. Les prélèvements les plus fréquemment utilisés sont la langue, la muqueuse des cavités orale et nasales, les intestins et le cerveau. Ces tissus sont fixés au formol, inclus dans la paraffine puis colorés à l'hémalun-éosine (McArthur et al., 2002). Des inclusions intranucléaires éosinophiliques caractéristiques peuvent être détectées au microscope à l'intérieur des cellules épithéliales. Elles apportent la confirmation d'une infection par un herpesvirus (Origgi, 2012). Cependant, le diagnostic histopathologique est limité car les inclusions sont généralement peu nombreuses voire absentes selon les individus. Par ailleurs, leur délai d'apparition et la durée pendant laquelle elles sont visibles reste encore indéterminé (Origgi, 2006). Elles seraient présentes pendant la phase aiguë de l'infection et ne seraient plus détectables à partir de quatre semaines après la dernière inoculation par le virus (Origgi et al., 2004). Cet examen est donc très spécifique mais peu sensible.

iii. Autres méthodes de diagnostic

Outre l'histopathologie, les tissus peuvent aussi être exploités pour la réalisation de PCR. Dans ce cas, la langue est le prélèvement à privilégier bien que l'œsophage, l'estomac, la trachée, le foie et le cerveau soient également utilisables. De la même façon, il est possible d'isoler le virus à partir de ces tissus (langue, trachée, poumons, foie) (McArthur et al., 2002).

Par ailleurs, l'immunohistochimie est une technique récente, en développement. Elle permet la détection de l'exposition (anticorps) ou de l'infection (antigènes) par un TeHV grâce à une coloration (Origgi et al., 2003). Mais la méthode est complexe et l'interprétation des résultats subjective. Elle est donc surtout utilisée pour confirmer un examen histopathologique (Origgi et al., 2003).

Ainsi, les diagnostics clinique et expérimental sont complémentaires. Tandis que le premier amène à une suspicion d'infection, le second en apporte la confirmation par des tests directs et indirects. La PCR et la sérologie sont les méthodes de laboratoire les plus employées et sont souvent associées car elles ne fournissent pas les mêmes conclusions. En phase active d'infection, les anticorps ne sont pas encore présents puisque la séroconversion a lieu après quatre à neuf semaines (McArthur et al., 2002). Les tests sérologiques sont alors obsolètes. Au contraire, le virus est excrété activement ce qui fait de la PCR la technique la plus appropriée. Inversement, au cours des phases chroniques et latentes de l'infection, les anticorps sont détectables par sérologie alors que le virus produit peu ou pas de nouvelles particules virales, rendant la détection d'ADN par PCR plus difficile. Les tests sérologiques sont plus faciles à réaliser mais apportent seulement une preuve indirecte de la présence de l'agent pathogène. C'est donc en combinant les deux méthodes qu'il est envisageable d'obtenir l'information la plus complète et précise concernant le statut de l'animal vis-à-vis d'une infection par un TeHV.

2. Diagnostic d'une infection par *Mycoplasma agassizii*

Comme précédemment, le diagnostic clinique est trop peu informatif pour permettre une conclusion. Il est toujours associé à des méthodes de laboratoire. Trois techniques sont couramment utilisées pour la détection de tortues infectées par *Mycoplasma agassizii*. Elles fournissent des informations différentes et complémentaires qui, mises en commun, donnent une idée précise du diagnostic (Jacobson et al., 2014).

a. Sérologie ELISA

Un test ELISA a été développé dans le but de détecter des anticorps spécifiques dirigés contre *Mycoplasma agassizii* dans du plasma ou du sérum (Schumacher et al., 1993). Il présente peu de réactions croisées avec *Mycoplasma testudineum*, autre agent responsable de syndrome rhinite-conjonctivite chez les tortues (Diemer Berish et al., 2000). Ainsi, dans le cas d'un animal présentant des signes cliniques évocateurs et une sérologie négative, il ne faut pas exclure la possibilité qu'une autre espèce de mycoplasmes (*Mycoplasma testudineum* ou une espèce non encore décrite) soit à l'origine de l'infection (Brown, Jacobson, 2002). Au contraire, certaines espèces de mycoplasmes peuvent posséder des antigènes ou des épitopes semblables à ceux de *Mycoplasma agassizii* sans pour autant qu'elles ne soient impliquées dans l'affection de l'individu testé. Ceci entraîne dans ce cas des faux positifs (Jacobson et al., 2014).

La sérologie n'est fiable qu'une fois la séroconversion effectuée, à partir de six à huit semaines suivant la primo-infection. Il est toujours plus intéressant de réaliser deux tests

successifs à six à huit semaines d'intervalle afin de déterminer si *Mycoplasma agassizii* est responsable d'une infection active. Dans ce cas, le taux d'anticorps doit significativement augmenter d'un test à l'autre. Si les deux titres en anticorps sont au contraire similaires, on peut uniquement conclure à une exposition passée (Origi, 2006).

Par ailleurs, les individus juvéniles peuvent être porteurs d'anticorps d'origine maternelle (AOM) dirigés contre *Mycoplasma agassizii*, acquis passivement à la naissance. Ils peuvent persister jusqu'à un an de vie (Brown, Jacobson, 2002). Les niveaux d'AOM sont d'autant plus élevés lorsque la mère est en phase aiguë d'infection au moment de la conception des œufs. Lorsqu'ils sont encore présents, ces AOM faussent donc l'interprétation d'un test sérologique (Jacobson et al., 2014).

Sa haute sensibilité (98%) et sa haute spécificité (99%) font du test ELISA une méthode incontournable de diagnostic d'une infection par *Mycoplasma agassizii* (Jacobson et al., 2014). Elle est simple à mener et l'obtention des résultats est rapide. Cependant, elle nécessite la réalisation d'un prélèvement sanguin, plus invasif qu'un écouvillon ou un rinçage nasal, et qui requiert des compétences techniques de la part de l'opérateur (Brown, Jacobson, 2002). En outre, l'interprétation des résultats doit être effectuée avec précaution. Tout d'abord, une unique sérologie positive n'informe que sur une exposition antérieure à l'agent pathogène mais ne donne aucune preuve d'infection actuelle (Diemer Berish et al., 2010). Ensuite, un faible risque de faux positifs persiste et est dû aux AOM et aux réactions croisées avec d'autres bactéries. Inversement, quelques faux négatifs sont obtenus si le prélèvement est effectué avant la séroconversion et si une autre espèce de mycoplasmes qui ne cross-réagit pas est responsable de l'infection (Jacobson et al., 2014 ; Soares et al., 2004).

b. Culture de mycoplasmes

La culture de mycoplasmes s'avère difficile à réaliser. En effet, elle requiert des conditions très spécifiques pour parvenir à leur développement comme une température de 30°C et des milieux de culture complexes (SP4[®]) contenant notamment du sérum (Brown et al., 1995). Celui-ci fournit en particulier le cholestérol nécessaire à la formation de la membrane cytoplasmique. De plus, la croissance des mycoplasmes est lente et il faut compter un délai d'au moins six semaines avant de pouvoir effectuer un premier isolement (Soares et al., 2004). Des antibiotiques (pénicilline, polymyxine B) sont parfois ajoutés au milieu de culture afin d'inhiber la croissance indésirable de certaines bactéries ou champignons appartenant au microbiote respiratoire normal des tortues. Il est également possible de faire passer les prélèvements à travers un filtre de 0,45 µm de diamètre dans le but de minimiser ces agents contaminants. Les cultures sont réalisées à partir d'écouvillons oro-pharyngés ou nasaux si un jetage est présent

mais aussi à partir de rinçage nasal (Brown, Jacobson, 2002 ; Jacobson et al., 2014). En milieu liquide, la croissance des mycoplasmes est détectée par un virage d'indicateurs colorés alors que sur gélose, des colonies apparaissent et prennent l'aspect d' « œuf au plat » (**Figure 8**), de « mûre » ou de « chou-fleur » au microscope électronique (Brown, Jacobson, 2002). Par ailleurs, les mycoplasmes semblent coloniser préférentiellement les surfaces muqueuses des dépressions ventrolatérales situées dans les cavités nasales, ce qui les rend difficilement accessibles sur un animal vivant (Brown et al., 1999). Les prélèvements par écouvillon se révèlent donc souvent peu informatifs si aucun jetage n'est objectivé (Brown, Jacobson, 2002).

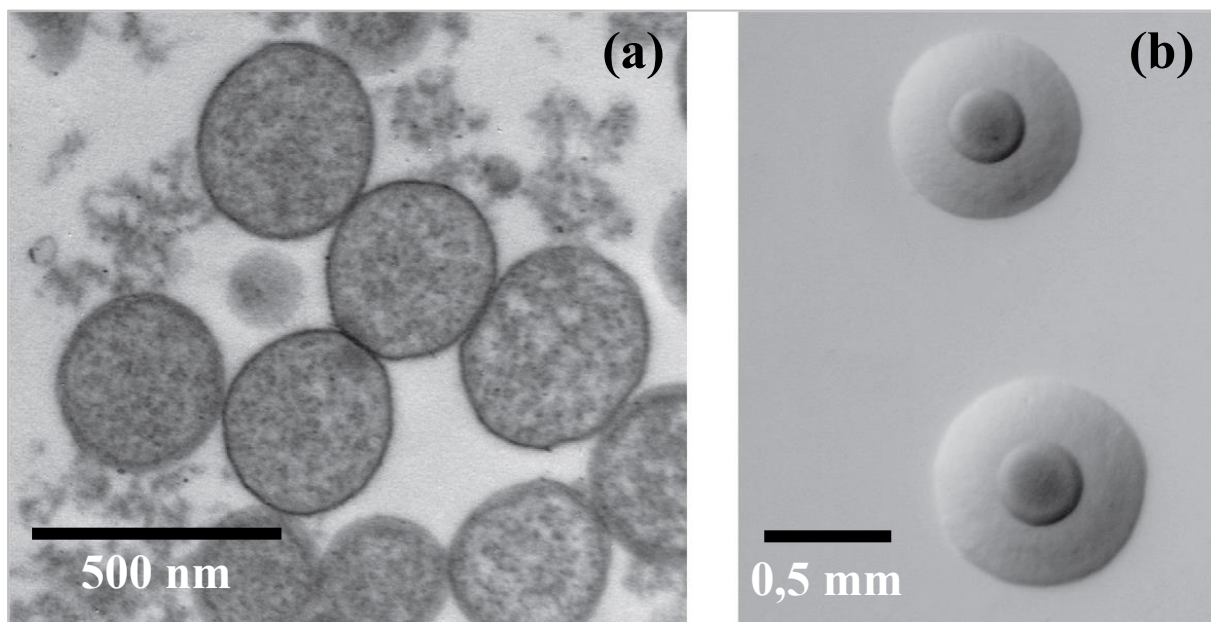


Figure 8 : Mycoplasmes au microscope : exemple de *Mycoplasma agalactiae*. (a) *Mycoplasma agalactiae* au microscope électronique à transmission illustrant la morphologie et la taille des mycoplasmes (Citti, Blanchard, 2013). (b) Aspect typique des colonies de *Mycoplasma* en « œuf au plat » sur un support solide après plusieurs jours d'incubation (Citti, Blanchard, 2013).

Cette méthode de diagnostic a l'avantage d'être non invasive et apporte une preuve irréfutable d'infection active au moment du prélèvement. Néanmoins, elle est rarement employée en pratique à cause des conditions de culture contraignantes et du délai d'obtention de résultats relativement long. De plus, cette technique ne permet pas de faire la distinction entre les différentes espèces de mycoplasmes. La sérologie reste donc la méthode la plus utilisée avec l'amplification d'ADN par PCR (Brown, Jacobson, 2002 ; Jacobson et al., 2014).

c. PCR

Le diagnostic de mycoplasmoses peut s'effectuer par PCR avec l'amplification d'une portion du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S constituant la petite sous-unité des ribosomes des procaryotes. Les amorces utilisées sont spécifiques du genre *Mycoplasma* : 5'-CCTATATTATGACGGTACTG-3' (amorce amont) et 5'-TGCACCATCTGTCA

CTCTGTAAACCTC-3' (amorce aval) et permettent l'obtention d'un amplicon de 576 pb (Brown et al., 1995). La PCR est généralement couplée à un séquençage ou une analyse RFLP afin de déterminer l'espèce de mycoplasme (Jacobson et al., 2014 ; Salinas et al., 2011). La difficulté de cette méthode réside dans la réalisation des prélèvements. Du vivant de l'animal, les écouvillons oro-pharyngés et les rinçages nasaux sont privilégiés. Mais de la même façon que pour la culture, il est complexe de parvenir à un échantillon contenant l'agent pathogène (Soares et al., 2004). Afin d'augmenter la sensibilité de détection, il est préférable de combiner les deux modes de prélèvements qui sont rapides à effectuer et peu invasifs (Jacobson et al., 2014). Il est également envisageable de réaliser des PCR à partir de tissus comme la langue, les poumons, le foie, les intestins et les reins. En outre, une qPCR spécifique de *Mycoplasma agassizii* et *Mycoplasma testudineum* a été développée afin d'établir une corrélation entre la charge bactérienne et l'intensité des signes cliniques (Jacobson et al., 2014).

De la même façon que la culture, la PCR n'est pas invasive et fournit une preuve directe de la présence de l'ADN de l'agent lors du prélèvement (Soares et al., 2004). En revanche, cette dernière est plus attractive car la réaction d'amplification n'est pas altérée par une contamination extérieure, la méthode est rapide et ne nécessite pas que l'agent recherché soit viable (Brown, Jacobson, 2002). Elle est spécifique mais moins sensible que les tests sérologiques du fait de la difficulté d'obtenir des échantillons représentatifs. Afin d'augmenter cette sensibilité, il est possible de réaliser au préalable des cultures à partir de rinçage nasal pour ensuite effectuer une PCR, bien que l'ajout de cette étape complexifie le processus (Brown, Jacobson, 2002). Par ailleurs, lorsque la PCR est négative alors que la sérologie est positive, il se peut également que l'agent ait été éliminé par l'organisme. Néanmoins, c'est un phénomène très rare dans le cas des infections par les mycoplasmes (Wendland et al., 2006).

d. Bilan : choix des tests

Il est parfois difficile de choisir la méthode de diagnostic que l'on souhaite utiliser car les différents tests décrits précédemment sont complémentaires. Le choix du test dépend de l'objectif de l'opérateur. En effet, la méthode adéquate est différente selon que l'on cherche à déterminer la cause des signes cliniques d'un individu, que l'on effectue une enquête de population ou encore que l'on réalise un suivi à long terme de la prévalence. L'idéal est d'associer toutes les techniques mais cette situation est rarement envisageable. Afin de limiter les manipulations, une sérologie a minima sur tous les animaux, complétée par une culture ou une PCR uniquement sur les animaux cliniques pourraient être envisagées (Brown, Jacobson, 2002).

V. Lutte

1. Prise en charge d'un syndrome « rhinite stomatite conjonctivite »

Le traitement mis en place lors d'un syndrome rhinite-stomatite-conjonctivite ou toute autre atteinte de l'appareil respiratoire supérieur n'a pas pour objectif d'éliminer totalement les agents pathogènes mais d'en diminuer fortement leur charge afin d'atténuer les signes cliniques qu'ils engendrent, d'éliminer les facteurs de stress et de renforcer le système immunitaire de la tortue afin qu'elle puisse lutter elle-même contre l'infection (Origgi, 2012 ; Ritchie, 2006). La priorité est de fournir des soins de support mais un traitement médical est couramment initié simultanément. Le traitement doit être mis en place pour les animaux symptomatiques mais aussi pour tous les individus qui ont été en contact avec ces derniers. Il est également indispensable d'instaurer des mesures de biosécurité afin de limiter la propagation des agents pathogènes (McArthur et al., 2002).

a. Soins de soutien

i. Optimisation de l'environnement

Les individus malades doivent bénéficier d'un environnement optimisé pour favoriser leur récupération. Un terrarium d'hospitalisation dans lequel la température, l'hygrométrie, la luminosité et la ventilation sont contrôlées est mis en place (McArthur et al., 2002). Concernant le substrat, le papier journal ou la litière de chanvre sont à privilégier car ils peuvent être changés souvent et ont peu de chances d'être ingérés (McArthur, 2004b). La nourriture est disposée dans une gamelle plate afin d'éviter l'ingestion de substrat en même temps que l'aliment. Il est important de multiplier les cachettes : une cachette au point chaud et une au point froid au moins, afin que la tortue puisse se cacher de la lumière ou de la chaleur en fonction de ses besoins (McArthur, 2004b). Si des bains quotidiens et une fluidothérapie font partie du plan thérapeutique, il n'est pas nécessaire d'ajouter une gamelle d'eau (McArthur, 2004b). Pour assurer une température optimale, il est nécessaire d'installer une source de chaleur. Les tortues hospitalisées étant moins actives et parfois immobiles, les systèmes de chauffage par le plancher du terrarium ne sont pas conseillés car ils peuvent entraîner des brûlures. Les lampes chauffantes sont plus couramment utilisées et sont mises en place d'un seul côté du terrarium afin de créer un gradient thermique à l'intérieur. La température peut être contrôlée grâce à un thermostat. Les valeurs optimales pour les tortues du genre *Testudo* sont

26-32°C le jour et 18-20°C la nuit (McArthur, 2004b). Dans un contexte pathologique, ces valeurs peuvent être augmentées de deux à trois degrés afin de stimuler la circulation sanguine et l'élimination rénale et d'obtenir une meilleure réponse immunitaire. L'hygrométrie doit aussi être maîtrisée et ne doit pas dépasser 40% chez les tortues du genre *Testudo* (McArthur et al., 2002). Elle est mesurée à l'aide d'un hygromètre et en cas d'atmosphère trop sèche, une brumisation d'eau tiède est recommandée. Au contraire, si l'environnement est trop humide, il faut favoriser la ventilation du terrarium (McArthur, 2004b). Concernant la luminosité, la tortue doit bénéficier de 12 heures de jour et 12 heures de nuit dans le but de se rapprocher au maximum du rythme circadien. Une lampe « lumière naturelle » reliée à un système de minuterie est généralement utilisée (Chitty, Raftery, 2013d). Enfin, une exposition aux rayonnements UV-B est indispensable, ceux-ci étant source de vitamine D3 par photoconversion de la provitamine D3, à l'origine de l'absorption intestinale de calcium. Ils peuvent se présenter sous différentes formes (tubes, spots, lampes) et intensités. Une lampe de 5% d'intensité allumée 10 heures par jour est idéale pour les tortues méditerranéennes. Les UV-B étant filtrés par le verre, il est important de placer la lampe directement à l'intérieur du terrarium ou au plafond de celui-ci à moins de 40 centimètres de l'animal (sans couvercle) (McArthur et al., 2002).

La brumation¹ ne doit généralement pas être envisagée quand l'animal est malade.

ii. Support nutritionnel

Dans de nombreux cas, les tortues présentant une rhinite perdent l'appétit et deviennent parfois totalement anorexiques du fait d'une altération de leur odorat, sens prépondérant dans la recherche de nourriture (Jacobson et al., 2014). Il est donc nécessaire d'aider à la prise alimentaire. Plusieurs techniques sont utilisées telles que l'alimentation à la main, le gavage à la seringue ou encore le sondage oro-gastrique permettant l'administration d'aliment liquide. Cependant, elles ont pour conséquence des manipulations très fréquentes qui occasionnent du stress chez la plupart des individus. Elles sont donc à employer à court terme uniquement (McArthur, 2004a). Or, l'hospitalisation peut durer jusqu'à plusieurs semaines (McArthur et al., 2002). La pose d'une sonde d'œsophagostomie sous anesthésie générale reste alors la meilleure option à long terme car elle est bien tolérée, limite les manipulations et n'empêche pas la tortue de s'alimenter spontanément. Il est possible d'administrer jusqu'à 3 mL pour 100 grammes de poids corporel d'aliment liquide par jour, à diviser en plusieurs repas (McArthur et al., 2002). Pour les individus présentant une anorexie prolongée, il ne faut fournir que 10 à

¹ Période de léthargie et d'inactivité hivernale chez les individus ectothermes induite par la baisse de température.

20% des besoins quotidiens au départ puis augmenter progressivement les quantités afin d'éviter une surcharge digestive ou un syndrome de renutrition (Huynh, 2008). La sonde d'œsophagostomie est maintenue en place jusqu'à reprise spontanée d'une alimentation satisfaisante. Malgré la présence de cette sonde, il est important de proposer quotidiennement de la nourriture fraîche (McArthur, 2004a).

iii. Fluidothérapie

Il est fréquent d'observer une déshydratation par défaut d'abreuvement chez les tortues infectées par un herpesvirus ou un mycoplasme. Elle est corrigée par l'administration de fluides par voie orale, intracœlomique, intraosseuse, intraveineuse sous-cutanée ou épicoelomique² en fonction du degré de déshydratation (Mitchell, 2006). La voie orale est intéressante pour les individus moyennement déshydratés (déshydratation inférieure à 5%). L'eau peut être versée à l'aide d'une seringue directement dans la bouche ou à l'aide d'une sonde gastrique. Cette dernière est à privilégier car elle permet une administration plus rapide et limite ainsi la durée de la manipulation et le risque de fausse déglutition. Si une sonde d'œsophagostomie est déjà en place, il est également possible d'administrer 5 ml/kg d'eau deux fois par jour directement dans la sonde. La voie sous-cutanée est peu utilisée car le taux d'absorption du fluide est très aléatoire. On peut l'employer uniquement en cas de déshydratation légère (Mitchell, 2006). Les voies épicoelomique, intracœlomique et intraosseuse sont beaucoup plus efficaces et sont utilisées pour les individus présentant une déshydratation de plus de 7% (McArthur, 2004a). Le volume administré doit représenter 1 à 3% du poids vif et 0,5 à 1% si une miction est objectivée (McArthur et al., 2002). La réhydratation est d'autant plus efficace que des bains sont effectués pendant 15-20 minutes quotidiennement ou biquotidiennement avec une eau à 30°C. Le fluide entrant par le cloaque est rapidement absorbé par la vessie et le côlon. Les bains permettent en outre de stimuler la miction et la défécation (McArthur, 2004a).

iv. Soins locaux

En plus des soins de support généraux, il est parfois nécessaire de réaliser des soins locaux spécifiques. Lors de stomatite par exemple, le retrait des débris nécrotiques à l'aide d'un coton tige suivi d'un nettoyage de la cavité orale avec de la povidone iodée diluée et d'un rinçage une fois par jour sont recommandés. Si des lésions majeures sont présentes, elles peuvent nécessiter un premier débridement et nettoyage sous anesthésie générale (McArthur et al., 2002). En cas de jetage, il est utile d'effectuer un lavage nasal avec une solution isotonique salée tiédie à 30-

² Espace entre le plastron et les muscles pectoraux : injection ventralement à la jonction scapulo-humérale, parallèlement et dorsalement au plastron, en direction du membre pelvien opposé (Boyer, 1998).

37°C injectée dans les deux narines à l'aide d'une canule de cathéter de 22-24 G une fois par jour (**Figure 7**). Il est parfois nécessaire de renouveler l'opération afin d'éliminer au maximum le mucus, les débris cellulaires solides et les éléments étrangers. A la solution isotonique salée, peuvent être ajoutés des antibiotiques locaux (doxycycline, clarithromycine, enrofloxacin) (Chitty, Raftery, 2013b).

v. Nébulisations

L'aérosolthérapie aide à dégager les voies respiratoires. Une solution saline stérile est en général utilisée mais il est possible de l'associer à des antibiotiques locaux, des agents mucolytiques et des bronchodilatateurs. Ces nébulisations peuvent être effectuées deux fois par jour pendant 15 à 20 minutes. Aucune étude démontrant leur efficacité n'a encore été menée mais elles semblent bénéfiques notamment pour favoriser la fluidification et l'élimination du mucus et donc permettre une meilleure distribution des molécules dans le tractus respiratoire. Néanmoins, ce traitement est contraignant d'autant plus qu'il est important de le poursuivre sur plusieurs semaines voire plusieurs mois (Chitty, Raftery, 2013b ; McArthur, 2004c).

vi. Analgésie

Certains signes cliniques reflètent une douleur chez la tortue comme par exemple une diminution de son activité et de sa prise alimentaire, un port anormal de sa tête et des yeux mi-clos. Ils sont relativement difficiles à détecter en comparaison avec les signes de douleur présents chez les mammifères (Perry, Nevarez, 2018). Les infections par un herpesvirus ou un mycoplasme sont parfois à l'origine de douleur à cause des signes cliniques et des lésions provoqués (stomatite, conjonctivite). Les opioïdes μ -agonistes comme la morphine (1-40 mg/kg IM et SC), la buprénorphine (0,02-0,1 mg/kg IM et SC) et le tramadol (10 mg/kg PO) sont employés dans la prise en charge des douleurs aiguës chez les reptiles (Klaphake et al., 2018 ; Perry, Nevarez, 2018 ; Spadola et al., 2015). Pour des douleurs plus chroniques, les anti-inflammatoires non stéroïdiens peuvent être utilisés après vérification de la fonction rénale de l'animal (méloxicam : 0,1-0,4 mg/kg, carprofène : 1-4 mg/kg IM, SC, PO et IV) (Klaphake et al., 2018 ; Perry, Nevarez, 2018 ; Schumacher, Yelen, 2006). Néanmoins, très peu d'études sont disponibles sur l'efficacité de ces molécules, leur pharmacocinétique et leur pharmacodynamique chez les reptiles. Leur utilisation est bien souvent empirique (Schumacher, Yelen, 2006).

b. Traitement étiologique

Les soins intensifs de support décrits précédemment sont indispensables pour avoir une chance de survie de l'individu infecté mais très souvent ils sont complétés par un traitement

médical anti-infectieux. Couramment, on combine des molécules antibiotiques, antivirales et antiparasitaires.

i. Antiviraux

L'utilisation des traitements antiviraux est généralement discutée (McArthur et al., 2002). Les molécules les plus souvent employées sont l'acyclovir et le gancyclovir qui ont pour objectif de réduire la réplication virale et ainsi d'atténuer les signes cliniques sans pour autant éliminer le virus puisqu'ils n'agissent pas sur les virus latents. Leur effet sur la croissance virale n'a été montré qu'in vitro sur le *TeHV-3* (Marschang et al., 1997). Aucune étude pharmacologique n'a encore démontré l'efficacité in vivo de ces derniers sur les TeHV ainsi que leur innocuité (McArthur et al., 2002 ; Origi, 2012). Par ailleurs, le peu d'études disponibles présentent des résultats différents. Certains auteurs ont mis en évidence une réduction significative de la réplication des herpesvirus après utilisation des antiviraux (Marschang et al., 1997) alors que d'autres ne voient aucune efficacité de l'acyclovir pour le traitement des infections par les herpesvirus chez les tortues terrestres (Haefeli, Schildiger, 1995).

En outre, il existe des posologies très variables dans la littérature pour ces deux molécules et certaines n'ont pas fait l'objet d'une étude. Une première posologie pour l'acyclovir de 80 mg/kg tous les 3 jours a été proposée mais elle correspondrait à une dose sub-thérapeutique et favoriserait donc la résistance du virus à la molécule (Schumacher, 1996). Par la suite, la dose a été augmentée à 80 mg/kg 1 fois par jour dans l'eau de boisson sur des animaux avec un syndrome rhinite-stomatite-conjonctivite (Origi, 2006). Par ailleurs, des résultats non significatifs mais encourageants ont été obtenus lors de l'utilisation de l'acyclovir à la dose de 30-80 mg/kg 3 fois par jour par la sonde d'œsophagostomie jusqu'à résolution des signes cliniques (soit environ 3 à 6 semaines pour des cas de stomatite) dans le contexte du traitement de tortues présentant une stomatite ou une atteinte de l'appareil respiratoire supérieur (McArthur, 2004c). L'auteur n'a mis en évidence ni complications ni effets secondaires à ce traitement sur plusieurs espèces de tortues différentes. En outre, l'acyclovir montrerait une meilleure efficacité lors de son utilisation pour une primo-infection par rapport à son emploi lors d'une récurrence (Marschang et al., 1997). Par ailleurs, l'application de pommade à base d'acyclovir à 5% localement sur les lésions de stomatite a montré des résultats encourageants (McArthur et al., 2002 ; Origi, 2012).

L'innocuité de l'acyclovir et du gancyclovir n'ayant pas été démontrée in vivo, leur utilisation est à réserver aux cas confirmés d'infections par un herpesvirus (Mitchell, 2006). En

effet, des possibles effets secondaires de ces molécules sont suspectés, notamment une certaine néphrotoxicité (Gandar et al., 2019).

L'acyclovir est parfois employé à faible dose à visée prophylactique mais cette pratique n'est pas recommandée car elle pourrait favoriser la résistance de l'agent pathogène à la molécule antivirale. Cependant, il pourrait être intéressant d'avoir recours à des agents du type interférons ou bioflavinoïdes pendant la période de pré-hibernation afin de limiter le risque de récurrence à la sortie de brumation tout en évitant de créer des résistances (McArthur et al., 2002).

Récemment, l'activité d'autres antiviraux a été testée sur *TeHV-3*. Ils se sont révélés intéressants en termes d'efficacité *in vitro*, mais plusieurs d'entre eux ont été à l'origine d'une certaine cytotoxicité. Seul l'éprociclovir a fait l'objet d'une étude pharmacocinétique et toxicologique *in vivo* car il s'est montré sans danger pour les cellules dans l'étude précédente (Gandar et al., 2019). L'étude a mis cependant en évidence une toxicité chronique de celui-ci après des injections quotidiennes pendant une semaine (doses : 5 et 10 mg/kg) avec des effets secondaires sur les reins (perte d'architecture du parenchyme), le foie (inflammation non spécifique, augmentation de l'activité des enzymes ASAT) et l'état général (anorexie, abattement). Son utilisation n'est donc pas recommandée. Cette même étude a d'ailleurs mis en évidence une activité réduite de l'acyclovir sur le génotype *TeHV-3* ce qui fait s'interroger sur son usage courant en pratique vétérinaire (Gandar et al., 2019).

ii. Antibiotiques

L'usage des molécules antibiotiques se fait dans le cas d'une infection par des mycoplasmes mais également souvent dans un contexte d'infection par un herpesvirus car celle-ci provoque un affaiblissement du système immunitaire de l'hôte favorisant des surinfections bactériennes secondaires (Chitty, Raftery, 2013b ; McArthur, 2004c). Par ailleurs, les infections mixtes (herpesvirus et mycoplasmes) sont relativement fréquentes (McArthur, 2004c). Les familles d'antibiotiques à privilégier sont les tétracyclines (oxytétracycline, doxycycline), macrolides (clarithromycine , tylosine), fluoroquinolones (enrofloxacin), phénicolés (chloramphénicol), lincosamides et certains aminoglycosides (gentamicine) (Hannan et al., 1997 ; Wendland et al., 2006). Aucune de ces molécules n'est complètement efficace face aux mycoplasmes. Par ailleurs, les fluoroquinolones, en tant que famille d'antibiotiques critiques, ne peuvent être utilisées qu'après réalisation d'un antibiogramme. Or, en pratique, les antibiogrammes ne sont pas effectués pour les mycoplasmes dont les cultures sont très complexes.

Un traitement par voie générale est mis en place en premier lieu. Néanmoins, les antibiotiques systémiques, même utilisés sur de longues périodes, ne permettent pas d'éradiquer les mycoplasmes car ceux-ci se localisent à la surface de l'épithélium nasal sans nécessairement pénétrer dans les tissus (Chitty, Raftery, 2013b ; Wendland et al., 2006). Conjointement, un traitement local à base d'antibiotiques et de corticostéroïdes peut leur être associé afin de limiter au maximum l'inflammation locale. C'est le cas par exemple pour la sphère oculaire avec l'application de collyres (gentamicine, bétaméthasone) une à deux fois par jour et la sphère respiratoire avec des nébulisations (gentamicine) ou des lavages des cavités nasales (gentamicine et bétaméthasone) tous les deux à trois jours (Johnson, 1998).

iii. Antiparasitaires

Le parasitisme constitue un facteur de stress participant à l'affaiblissement du système immunitaire. Par ailleurs, la période d'hibernation correspond à une phase où les défenses immunitaires sont diminuées. Les tortues sont ainsi plus sensibles à divers agents pathogènes en sortie d'hibernation. Aux infections virales ou bactériennes s'ajoutent donc souvent une infestation parasitaire (McArthur, 2004c). Il est donc recommandé d'effectuer un traitement antiparasitaire lors d'un syndrome rhinite-stomatite-conjonctivite mais aussi de manière préventive un mois avant l'hibernation sur des tortues en bonne santé. Il est intéressant de réaliser une coproscopie au préalable afin d'identifier les parasites présents et ainsi de choisir la molécule la plus adaptée. Le lévamisole (2 injections de 5 mg/kg IM à 15 jours d'intervalle) et le fenbendazole (25-100 mg/kg PO tous les 15 jours jusqu'à 4 traitements) sont couramment utilisés contre les nématodes (Klaphake et al., 2018). Pour l'élimination des cestodes et des trématodes, c'est le praziquantel qui est employé (8 mg/kg PO, SC ou IM en 2 traitements à 15 jours d'intervalle) (Klaphake et al., 2018). Une alternative possible est d'appliquer par voie cutanée un mélange d'émodepside et de praziquantel afin de lutter contre les nématodes, les cestodes et les trématodes en même temps (1,12 mL/kg en spot on de Profender spot-on[®]) (Klaphake et al., 2018). Enfin, le métronidazole (25 mg/kg PO une fois par jour pendant 5 jours) est utilisé dans le cas d'infestations par des flagellés (Klaphake et al., 2018).

c. Efficacité du traitement

Ainsi, la lutte contre les infections provoquées par un herpesvirus ou un mycoplasme est laborieuse. Le traitement est souvent mis en place sur de longues périodes, de quelques semaines à plusieurs mois. Par ailleurs, les composantes de ce traitement n'agissent pour la plupart que sur les complications de l'infection avec l'objectif d'atténuer les signes cliniques

par une thérapie symptomatique. Malgré une prise en charge intensive, certains individus ne survivent pas ou montrent une détresse telle qu'il devient nécessaire de les euthanasier.

Bien que les tortues puissent survivre à l'infection primaire grâce au traitement mis en place, leur guérison complète reste illusoire car l'élimination du virus ou du mycoplasme est très rare. L'infection devient latente et les taux de mortalité ont tendance à augmenter dans les années qui suivent, notamment en période de post-hibernation (Marschang, 2011). Une phase symptomatique peut également réapparaître quelques années plus tard sous forme de récurrence de l'infection, notamment lors de l'introduction d'un nouvel animal (McArthur et al., 2002).

2. Mesures préventives

Le traitement contre les infections par des herpesvirus ou des mycoplasmes restant à ce jour empirique et avec une efficacité très aléatoire, la prévention constitue pour l'instant le meilleur outil pour lutter contre ces agents pathogènes et juguler leur dissémination (Origgi, 2012).

a. Limiter la dissémination de l'infection

La première mesure à mettre en œuvre est d'isoler les individus malades, sur un site différent idéalement, du fait de la contagiosité des agents infectieux (Blahak, Biermann, 1995 ; Jacobson et al., 1985 ; Origgi et al., 2001). Aucun contact ne doit avoir lieu entre les animaux a priori sains et ceux présentant des signes cliniques ou des lésions évocatrices (Jacobson et al., 1985). Cependant, les individus asymptomatiques sont aussi susceptibles d'être porteurs d'un TeHV ou de *Mycoplasma agassizii*. Idéalement, il est alors intéressant d'effectuer des tests sérologiques et des PCR sur tous les animaux afin de détecter et isoler les porteurs asymptomatiques (Origgi, 2012). Les sensibilités aux infections étant différentes d'une espèce de tortue à l'autre, il est recommandé de ne pas mélanger les espèces au sein d'un même enclos ou terrarium (Marschang et al., 1997). Enfin, la surpopulation est à éviter absolument car elle est source de contacts rapprochés entre les animaux et favorise donc la transmission des agents pathogènes (Origgi, 2012).

Les terrariums dans lesquels les tortues malades sont placées doivent être construits à partir de matériaux faciles à nettoyer. Le terrarium ainsi que tous les objets en contact avec les animaux porteurs ou malades nécessitent une désinfection à l'eau de javel diluée à 10% (diluer 100 millilitres d'eau de javel pour un litre d'eau) (Origgi, 2012). Par ailleurs, le port de gants jetables est fortement recommandé ainsi que la désinfection des mains entre les soins de chaque animal (Blahak, Biermann, 1995).

b. Prévenir l'introduction d'un agent pathogène

Il est préférable de mettre en place une quarantaine de trois à six mois minimum pour tout nouvel individu introduit (Bicknese et al., 2010 ; Jacobson et al., 1985 ; Origgi, 2012). Les soins des animaux de la quarantaine sont à effectuer en dernier (McArthur et al., 2002). Conjointement, il est préférable d'appliquer des mesures de biosécurité comme le changement de chaussures d'un enclos à l'autre ou le port de sur-chaussures, le port de gants ou le lavage et désinfection des mains entre chaque animal (Blahak, Biermann, 1995). La latence de l'infection pouvant durer plusieurs années, la quarantaine ne suffit pas à affirmer avec certitude qu'une tortue est porteuse ou non. Il apparaît alors indispensable de dépister les nouveaux animaux (Marschang et al., 2001). Deux sérologies à huit semaines d'intervalle sont recommandées afin de limiter le risque de faux négatifs dans le cas où la première serait effectuée avant la séroconversion. L'individu est reconnu négatif si les deux tests sont négatifs. Il est intéressant d'associer le test sérologique à une PCR mais là encore, le résultat peut revenir négatif si le virus ou le mycoplasme n'est pas en phase d'excrétion (McArthur et al., 2002).

PARTIE 2 : Etude expérimentale de la prévalence des *Testudinid herpesvirus* et de *Mycoplasma agassizii* au sein d'un refuge

I. Matériel et méthodes

1. Lieu et moment de l'étude

L'étude s'est déroulée au refuge des tortues de Bessières, dans le département de la Haute-Garonne en Occitanie. Ce refuge accueille un grand nombre de tortues d'espèces variées, abandonnées, trouvées ou saisies. Il est géré par l'Association du Refuge des Tortues dont le responsable et capacitaire est Jérôme Maran. Il s'étend actuellement sur 10 000 mètres carrés (Rousselot, 2019). Il comprend 14 enclos pour les tortues terrestres (***Figure 9***) et 12 bassins pour les tortues aquatiques ainsi qu'une zone de quarantaine implantée sur le même site mais séparée physiquement des enclos et des bassins. Une seule espèce est retrouvée par enclos. Les mâles et les femelles sont également séparés. Les effectifs sont variables d'un enclos à l'autre (de 4 à 37 individus dans les enclos étudiés). Le refuge est depuis peu ouvert au public. Les prélèvements ont été effectués le 9 avril 2019, peu après la sortie de brumation de l'hiver 2018-2019.



Figure 9 : Photographie de l'enclos n°2 abritant des tortues d'Hermann.

2. Récolte des données

a. Population d'étude

Les espèces ciblées pour l'étude sont des espèces de tortues terrestres du genre *Testudo* : la Tortue des steppes (*Testudo horsfieldii*), la Tortue grecque (*Testudo graeca*), la Tortue d'Hermann (*Testudo hermanni* sous-espèces *hermanni* et *boettgeri*) et la Tortue bordée (*Testudo marginata*) (**Tableau 2**). Des prélèvements ont été réalisés sur 44 tortues, dont 25 mâles et 19 femelles d'âges indéterminés (mais tous adultes) dans 10 enclos différents. Dans la plupart des cas, cinq tortues ont été prélevées aléatoirement par enclos. Cependant, ces exigences n'ont pas pu être respectées dans les enclos 2, 4 et 10 par manque d'effectif ou lorsque les prélèvements se sont avérés impossibles à réaliser (**Figure 10**).

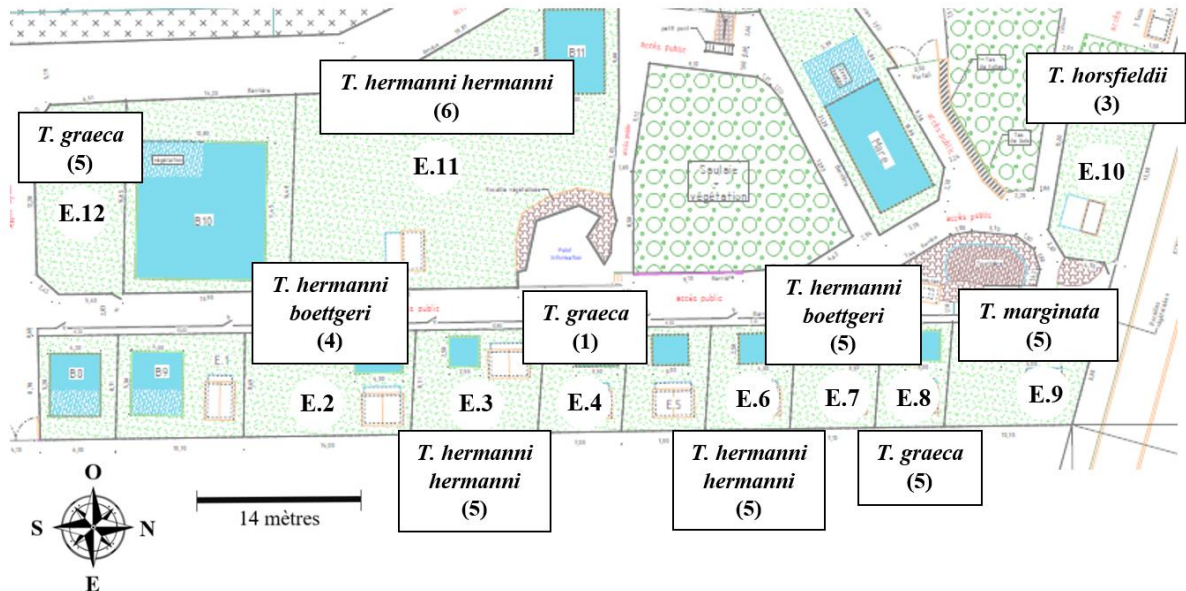


Figure 10 : Plan du refuge comprenant les effectifs de tortues prélevés par enclos.

Tableau 2 : Effectif de tortues prélevées par espèce.

Espèce prélevée	Effectif
Tortue des steppes (<i>Testudo horsfieldii</i>)	3
Tortue grecque (<i>Testudo graeca</i>)	11
Tortue d'Hermann (<i>Testudo hermanni hermanni</i>)	16
Tortue d'Hermann (<i>Testudo hermanni boettgeri</i>)	9
Tortue bordée (<i>Testudo marginata</i>)	5
	44

b. Réalisation des prélèvements

Pour chaque tortue, un examen clinique préalable est réalisé. Il comporte un examen à distance avec une évaluation de l'état de vigilance, l'état d'embonpoint et l'état d'hydratation de l'animal. Il est suivi par un examen rapproché avec en particulier la recherche de signes d'atteinte de l'appareil respiratoire supérieur : altération de la respiration, écoulements oculaire et nasal, signes de conjonctivite et de stomatite. Enfin, chaque tortue est pesée et mesurée.

Les échantillons sont obtenus par la réalisation d'un écouvillon oro-pharyngé. Un rinçage nasal est également effectué avec 0,5 mL de solution saline stérile injecté dans chaque narine à l'aide d'un cathéter stérile de 22 G fixé à une seringue de 3 millilitres dont le mandrin est retiré. Le liquide est ensuite immédiatement ré-aspiré et le surplus de fluide sortant des narines est épongé à l'aide de l'écouvillon utilisé précédemment. Le contenu de la seringue et l'écouvillon sont conservés dans un même tube Eppendorf à 4°C pendant la durée du transport. Les échantillons sont ensuite congelés le jour même à -20°C.

c. Exploitation des échantillons par PCR

i. Extraction d'ADN

Préalablement à la PCR, l'ADN génomique de chaque échantillon a été extrait à l'aide du kit EZ-10 Spin Column Blood & Tissue Genomic DNA Mini-preps Kit® (Bio Basic) selon les recommandations du fabricant pour les cultures cellulaires. Aux 44 échantillons, se sont ajoutés quatre témoins d'extraction négatifs (X1, X2, X3 et X4). Lors de l'extraction, 200 µL de l'échantillon sont mélangés à 200 µL de PBS, 200 microlitres de solution tampon CL et 20 µL de protéinase K. Le mélange est incubé pendant 10 minutes au bain marie à 56°C pour permettre la lyse des cellules et l'élimination des protéines. Ensuite, 200 µL d'éthanol sont incorporés afin de faire précipiter l'ADN. Le tout est transféré dans des colonnes (*EZ-10 Spin Columns*) placées dans des tubes collecteurs de 2 mL, puis centrifugé pendant une minute à 9000 rcf. Les tubes collecteurs sont changés et 500 µL de solution CW1 sont ajoutés dans les colonnes pour

permettre le rinçage. Une centrifugation similaire à la précédente est renouvelée. La même opération est effectuée avec la solution CW2. L'étape de séchage consiste à réaliser une centrifugation supplémentaire pendant 2 minutes à 9000 rcf. Les colonnes sont ensuite placées dans des tubes Eppendorf® de 1,5 mL à température ambiante pendant 3 minutes jusqu'à évaporation complète de l'éthanol. Enfin, 50 µL de tampon d'éluion CE sont déposés au centre de la membrane. La colonne est incubée à température ambiante pendant 2 minutes puis une dernière centrifugation est réalisée pendant 1 minute à 9000 rcf et a pour but de resuspendre l'ADN dans la solution tampon. Les produits d'extraction sont conservés au congélateur à -20°C.

ii. PCR consensus pan-herpesvirus (VanDevanter et al., 1996)

La PCR utilisée a pour cible une séquence de 215 à 315 pb du gène codant pour l'ADN polymérase des herpesvirus. Cette séquence est très conservée au sein de la famille des *Herpesviridae* et sa faible spécificité permet donc de détecter une large gamme d'herpesvirus de nombreuses espèces animales. Cette PCR étant nichée, deux PCR identiques sont effectuées successivement, l'ADN employé pour la deuxième étant le produit de la première. Les amorces utilisées sont dégénérées. Les séquences des amorces sont détaillées dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 : Amorces employées pour la PCR consensus pan-herpesvirus.

	Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce (5' → 3')	Sens de lecture	Référence bibliographique
PCR 1	DF A	GAYTTYGCNAGYYTNTAYCC	Sens	<i>VanDevanter 1996</i>
	ILK	TCCTGGACAAGCAGCARNYSGCNMTNAA	Sens	
	KG1	GTCTTGCTCACCAGNTCNACNCCYTT	Anti-sens	
PCR 2	TGV	TGTA ACTCGGTGTAYGGNTTYACN GGNGT	Sens	
	IYG	CACAGAGTCCGTRTCNCCRTADAT	Anti-sens	

Le kit KAPA Taq PCR® est utilisé pour la réalisation de tous les mix des différentes PCR menées au cours de l'étude. Les compositions des mix des deux PCR sont rapportées respectivement dans les **Tableau 4** et **Tableau 5**.

Tableau 4 : Composition du mix de la PCR 1 de la PCR consensus pan-herpesvirus avec le KAPA Taq PCR kit, pour 25 μ L finaux.

Réactif	Volume pour un échantillon (μ L)
10X KAPA Taq Buffer A	2,5
dNTP 10 mM	0,5
Amorce DFA 10 μ M	2,5
Amorce ILK 10 μ M	2,5
Amorce KG1 10 μ M	2,5
Eau	11,4
5 U/ μ L KAPA Taq DNA Polymerase	0,1
ADN (échantillon)	3

Tableau 5 : Composition du mix de la PCR 2 de la PCR consensus pan-herpesvirus avec le kit KAPA Taq PCR, pour 25 μ L finaux.

Réactif	Volume pour 1 échantillon (μ L)
10X KAPA Taq Buffer A	2,5
dNTP 10 mM	0,5
Amorce TGV 10 μ M	2,5
Amorce IYG 10 μ M	2,5
Eau	14,9
5 U/ μ L KAPA Taq DNA Polymerase	0,1
ADN (échantillon)	2

Les conditions d'amplification pour les deux PCR sont répertoriées dans le **Tableau 6**.

Tableau 6 : Conditions d'amplification des PCR 1 et 2 de la PCR consensus pan-herpesvirus.

Température	Temps	Nombre de cycles
95°C	3 min	x 1
95°C	30 s	x 45
46°C	30 s	
72°C	1 min	
72°C	1 min	x 1

iii. PCR pour la détection de *Mycoplasma* spp. (Robertson et al., 1993)

Cette PCR cible une séquence de 1,5 kb du gène 16S de l'ARN ribosomique codant pour la petite sous-unité des ribosomes. Elle permet entre autres la détection de *Mycoplasma agassizii* et *Mycoplasma testudinis*. Les séquences des amorces employées sont 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGA-3' en amont (MycTor_F) et 5'-GGTAGGGATACCTTGTTACGACT-3' en aval (MycTor_R). La composition du mix et les conditions de réalisation de la PCR sont détaillées dans le Tableau 7 et le Tableau 8 respectivement.

Tableau 7 : Composition du mix de la PCR *Mycoplasma* spp. avec le kit KAPA Taq PCR, pour 25 µL finaux.

Réactif	Volume pour 1 échantillon (µL)
10X KAPA Taq Buffer A	2,5
dNTP 10 mM	0,5
Amorce MycTor_F 10 µM	1
Amorce MycTor_R 10 µM	1
Eau	16,9
5 U/µL KAPA Taq DNA Polymerase	0,1
ADN (échantillon)	3

Tableau 8 : Conditions d'amplification de la PCR *Mycoplasma* spp.

Température	Temps	Nombre de cycles
95°C	3 min	x 1
95°C	30 s	x 35
58°C	30 s	
72°C	1 min	
72°C	1 min	x 1

iv. PCR pour la détection de *Mycoplasma agassizii* (Brown et al., 1995)

Une deuxième PCR a été réalisée dans le but de rechercher plus spécifiquement *Mycoplasma agassizii* avec de nouvelles amorces. Elle a pour cible une séquence de 576 pb du gène 16S de l'ARN ribosomique et utilise l'amorce amont 5'-

CCTATATTATGACGGTACTG-3' (Myc-agfor1) et l'amorce aval 5'-TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC- 3' (Myc-agrev1). La composition du mix et les conditions de réalisation de la PCR sont détaillées dans le **Tableau 9** et le **Tableau 10** respectivement.

Tableau 9 : Composition du mix de la PCR *Mycoplasma agassizii* avec le kit KAPA Taq PCR, pour 25 µL finaux.

Réactif	Volume pour 1 échantillon (µL)
10X KAPA Taq Buffer A	2,5
dNTP 10 mM	0,5
Amorce Myc-agfor1 10 µM	1
Amorce Myc-agrev1 10 µM	1
Eau	16,9
5 U/µL KAPA Taq DNA Polymerase	0,1
ADN (échantillon)	3

Tableau 10 : Conditions d'amplification de la PCR *Mycoplasma agassizii*.

Température	Temps	Nombre de cycles
95°C	3 min	x 1
95°C	30 s	x 45
55°C	30 s	
72°C	45 s	
72°C	45 s	x 1

v. Electrophorèse

Les produits des diverses amplifications sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. Les éléments nécessaires pour la préparation du gel sont répertoriés dans le **Tableau 11**. Les gels sont placés dans une cuve d'électrophorèse avec une tension entre les électrodes de 90 volts pendant une heure à une heure et demie selon la taille attendue de l'amplicon. Les résultats sont mis en évidence par l'exposition des gels à des rayonnements ultraviolets.

Tableau 11 : Composition du gel d'agarose concentré à 1%.

Réactif	Quantité
Tampon de migration TBE 0,5X	40 mL
Poudre d'agarose	0,4 g
SYBR [®] Safe (agent intercalant)	4 µL

d. Séquençage

i. Extraction et purification d'ADN

Les échantillons positifs ou douteux (faible signal sur le gel d'agarose) en PCR sont ensuite analysés par séquençage. Pour se faire, il est nécessaire de découper la bande de gel correspondant à l'amplicon à l'aide d'une lame de scalpel à usage unique et veiller à récupérer la quantité minimale de gel. L'ADN contenu dans le gel est ensuite extrait et purifié avec le QIAquick Gel Extraction Kit[®] (Qiagen). Les différentes étapes réalisées sont présentées dans le **Tableau 12**.

Tableau 12 : Description des étapes de l'extraction et de la purification d'ADN avec le kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen).

Etape	Description	Rôle
1	Ajout de 3 volumes de Buffer QG pour un volume de gel : 5.5 M guanidine thiocyanate, 20 mM Tris HCl (pH 6.6) Incubation du mélange 10 minutes à 56°C Agitation des tubes à mi-temps à l'aide d'un vortex	Dissolution du gel
2	Ajout d'un volume d'isopropanol pour un volume de gel Transfert des mélanges dans des colonnes (QIAquick spin column) placées dans des tubes collecteurs de 2 mL Centrifugation 1 minute à 13000 rpm	Précipitation de l'ADN sur la colonne
3	Ajout de 500 µL de Buffer QG Centrifugation 1 minute à 13000 rpm	Lavage
4	Ajout de 750 µL de Buffer PE : 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 80% éthanol Incubation 5 minutes à température ambiante Centrifugation 1 minute à 13000 rpm	Lavage
5	Centrifugation 1 minute à 13000 rpm	Séchage
6	Transfert des colonnes dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL Ajout de 30 µL de Buffer EB (tampon d'élution) : 10 mM Tris·Cl (pH 8,5) Incubation 4 minutes à température ambiante Centrifugation 1 minute à 13000 rpm	Remise en suspension de l'ADN

ii. Quantification d'ADN

L'ADN contenu dans les tubes est ensuite quantifié à l'aide d'un lecteur de microplaques multimode, le CLARIOstar® par dépôt de 2 µL de chaque ADN sur une plaquette. Les résultats fournis par l'appareil sont la concentration d'ADN en ng/mL et sa pureté.

iii. Envoi séquençage

Pour effectuer le séquençage dans les deux directions (sens et anti-sens), deux tubes sont préparés pour chaque prélèvement. Dans le cas de la détection d'un TeHV, le premier tube contient 2,5 µL d'amorce TGV à 10 µM et 7,5 µL d'ADN et le deuxième contient 2,5 µL d'amorce IYG à 10 µM et 7,5 µL d'ADN. Pour la détection de *Mycoplasma agassizii*, la préparation est identique mis à part les amorces utilisées (respectivement MycTor_F et

MycTor_R pour la PCR *Mycoplasma spp.* et Myc-agfor1 et Myc-agrev1 pour la PCR *Mycoplasma agassizii*). Le séquençage est réalisé grâce à la méthode de Sanger dans un laboratoire prestataire (Eurofins). Les chromatogrammes et séquences obtenus sont ensuite observés et édités manuellement à l'aide du logiciel BioEdit® pour d'éventuelles erreurs. Les séquences sont ensuite comparées aux séquences déposées dans la base de données GenBank® par le biais du site BLAST du NCBI (National Center for Biotechnology Information).

3. Analyse statistique des données

Les analyses statistiques sont effectuées à l'aide du logiciel R® (version 3.6.1). Considérant les faibles effectifs, le test exact de Fisher est utilisé pour toutes les analyses statistiques. Une P-value $\leq 0,05$ est choisie comme valeur significative.

II. Résultats

1. Résultats PCR en fonction de l'espèce de tortue prélevée

a. Résultats de la PCR *Mycoplasma spp.* (Robertson et al., 1993)

Mycoplasma spp. a été détecté chez 21 tortues (48%) sur les 44 testées. Toutes les tortues des steppes et les tortues bordées sont revenues négatives à la PCR (4 et 5 tortues respectivement). Des résultats positifs ont été obtenus pour 6 individus (55%) sur les 11 tortues grecques et 15 individus (60%) sur les 25 tortues d'Hermann dont 5 tortues appartiennent à la sous-espèce *Testudo hermanni boettgeri* (56% de résultats positifs sur 9 individus) et 10 à la sous-espèce *Testudo hermanni hermanni* (63% de résultats positifs sur 16 individus). Ces résultats sont rapportés dans le **Tableau 13**.

Tableau 13 : Animaux testés et résultats des PCR pour *Mycoplasma* spp. (Robertson et al., 1993), *Mycoplasma agassizii* (Brown et al., 1995) et *herpesvirus* (VanDevanter et al., 1996) triés par espèce.

Espèce	Effectif	Positif <i>Mycoplasma</i>	Positif <i>M.</i> <i>agassizii</i>	Positif <i>Herpesvirus</i>
<i>T. horsfieldii</i>	3	0 (0%)	3 (100%)	0 (0%)
<i>T. marginata</i>	5	0 (0%)	1 (20%)	0 (0%)
<i>T. graeca</i>	11	6 (55%)	6 (55%)	1 (9%)
<i>T. hermanni</i> :	25	15 (60%)	16 (64%)	2 (8%)
<i>T. hermanni</i> <i>boettgeri</i>	9	5 (56%)	5 (56%)	2 (22%)
<i>T. hermanni</i> <i>hermanni</i>	16	10 (63%)	11 (69%)	0 (0%)

Les échantillons positifs ont par la suite été envoyés pour séquençage. Cependant, de nombreux résultats présentaient un bruit de fond trop important pour permettre d'identifier distinctement une séquence. Seules quatre séquences ont été comparées avec la banque de données GenBank® et ont présenté 99% d'identité avec une séquence issue d'une souche de *Mycoplasma agassizii* (GenBank : KY212530.1). Vu le peu de séquences analysées, une autre PCR a été effectuée.

b. Résultats de la PCR Mycoplasma agassizii (Brown et al., 1995)

La prévalence calculée pour *Mycoplasma agassizii* est de 59% (26 tortues positives sur 44, IC 95% : [45%-72%]). Des résultats positifs ont été obtenus pour 3 individus (100%) sur les 3 tortues des steppes, 1 individu (20%) sur les 5 tortues bordées, 6 individus (55%) sur les 11 tortues grecques et 16 individus (64%) sur les 25 tortues d'Hermann dont 5 tortues appartiennent à la sous-espèce *Testudo hermanni boettgeri* (56% de résultats positifs sur 9 individus) et 11 à la sous-espèce *Testudo hermanni hermanni* (69% de résultats positifs sur 16 individus) (**Annexe I**). Ces résultats sont représentés dans le **Tableau 13**. Les prévalences, calculées en considérant une sensibilité de la PCR de 97% et une spécificité de 98% des PCR avec des intervalles de confiance à 95% (Sergeant, 2019), sont présentées dans la **Figure 11**.

L'analyse statistique des données montre qu'il n'y a pas de différence significative de prévalence entre les espèces de tortues ($p\text{-value} = 0,23 > 0,05$).

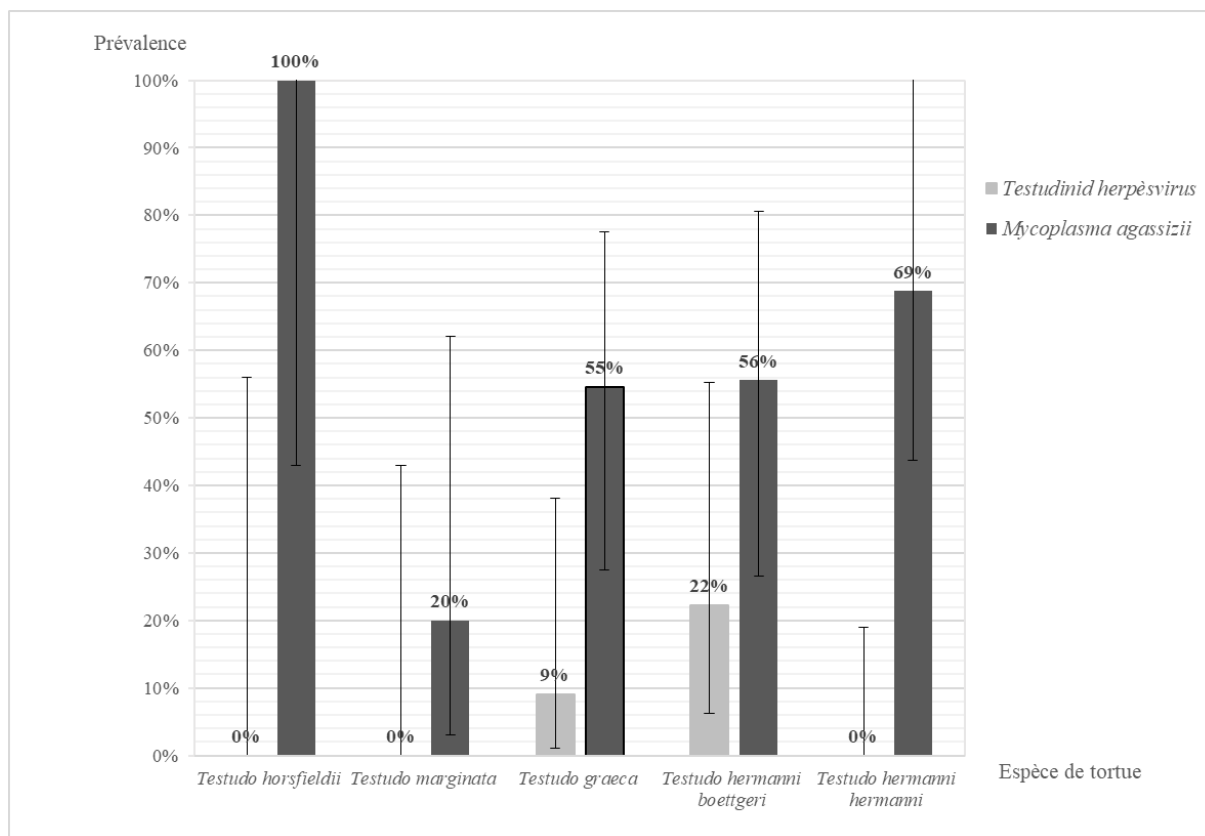


Figure 11 : Prévalence des *Testudinid herpesvirus* et de *Mycoplasma agassizii* en fonction de l'espèce de tortue prélevée dans le refuge. Les prévalences ont été calculées en considérant une sensibilité de la PCR de 97% et une spécificité de 98% des PCR. Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95%.

De la même manière que précédemment, les échantillons positifs ont été séquencés. Les résultats ont pu être exploités manuellement à l'aide du logiciel BioEdit®. La comparaison des séquences obtenues avec celles disponibles dans la base de données GenBank® a montré 100% d'identité avec une séquence issue d'une souche de *Mycoplasma agassizii* déjà décrite (GenBank : KY212536.1). Une unique souche semble donc être présente au sein des différentes espèces de tortue testées dans le refuge.

c. Comparaison des résultats pour les PCR ciblant *Mycoplasma spp.* et *Mycoplasma agassizii*

Les résultats obtenus après chacune des PCR ciblant les mycoplasmes diffèrent légèrement. En effet, les résultats coïncident entre les deux pour 35 prélèvements soit 80% des résultats (respectivement 19 résultats positifs et 16 résultats négatifs). A contrario, 9 prélèvements (20%) ne donnent pas les mêmes résultats : 2 échantillons sont positifs à la PCR 1 et négatifs à la PCR

2 et inversement pour les 7 autres (**Tableau 14**). Ces deux tests PCR donnent des résultats significativement associés (p-value < 0,001).

Tableau 14 : Comparaison des résultats des deux PCR effectuées ciblant les mycoplasmes.

		PCR 1 (Robertson et al., 1993)	
		Résultat positif	Résultat négatif
PCR 2 (Brown et al., 1995)	Résultat positif	19 (43%)	7 (16%)
	Résultat négatif	2 (5%)	16 (36%)

d. Résultats de la PCR pan-herpesvirus (VanDevanter et al., 1996)

La prévalence calculée pour les herpesvirus est de 7% (3 tortues positives sur 44, IC 95% : [2%-18%]). Des résultats positifs ont été obtenus uniquement chez la Tortue grecque et la Tortue d'Hermann avec respectivement 1 test positif (9%) sur 11 et 2 tests positifs (8%) sur 25. Ces deux derniers individus positifs appartiennent à la sous-espèce *Testudo hermanni boettgeri* (2 tests positifs sur 9 tortues soit 22%). Ces résultats sont résumés dans le **Tableau 13** et la **Figure 11**. De la même façon que pour *Mycoplasma agassizii*, il n'y a pas de différence statistique entre espèces de tortue.

Après séquençage, une seule séquence a pu être obtenue sur les trois résultats positifs de PCR pan-herpesvirus. Elle présente 96% d'identité avec une séquence issue d'une souche de *TeHV-3* (GenBank : KR363629.1).

2. Lien entre le statut clinique et la prévalence

Après évaluation des animaux sélectionnés dans l'étude, huit individus (18%) ont été identifiés comme symptomatiques d'une rhinite : sept tortues présentaient des symptômes oculaires (épiphora unilatéral ou bilatéral, chassie, blépharite) dont une présentait en plus un jetage nasal et une tortue présentait un mauvais état général avec une déshydratation et un amaigrissement.

Parmi ces individus cliniques, cinq (63%) sont positifs pour *Mycoplasma agassizii* et un (13%) est positif pour les TeHV. Les résultats sont présentés dans la **Figure 12** et la **Figure 13**.

Toutefois aucune différence significative de prévalence pour les TeHV et *Mycoplasma agassizii* n'a été mise en évidence entre animaux sains et cliniques.

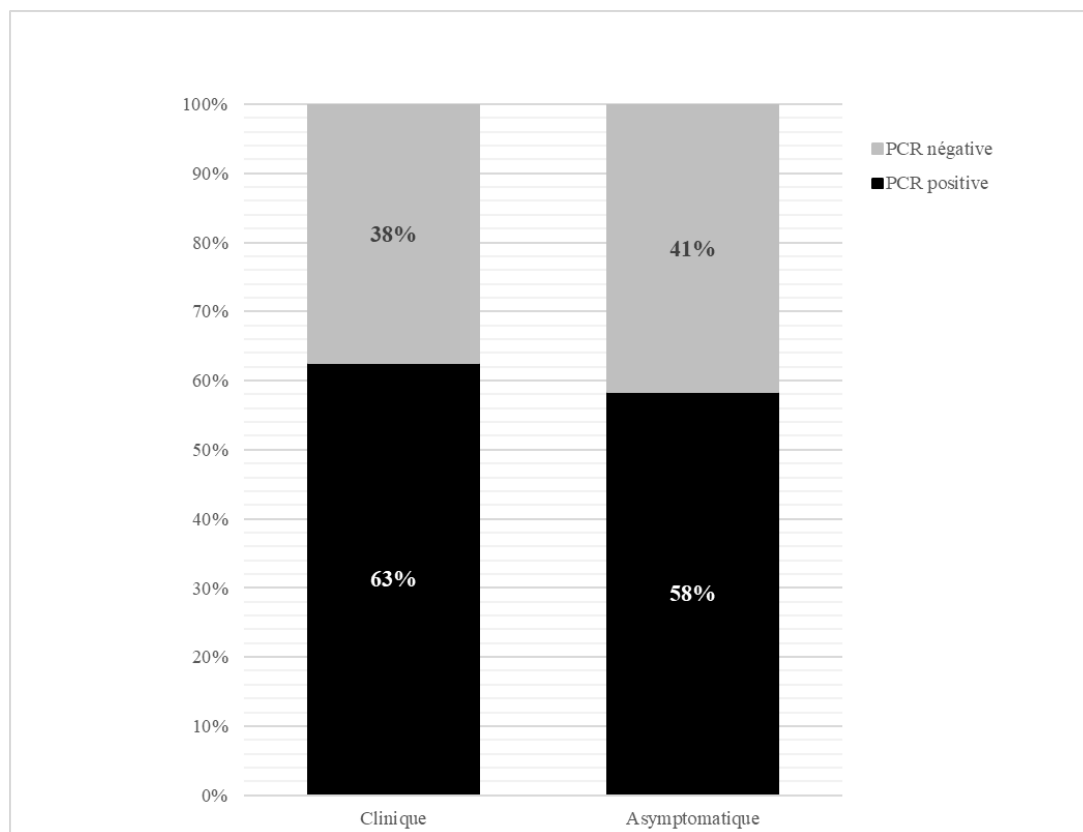


Figure 12 : Distribution des résultats de PCR *Mycoplasma agassizii* selon le statut clinique.

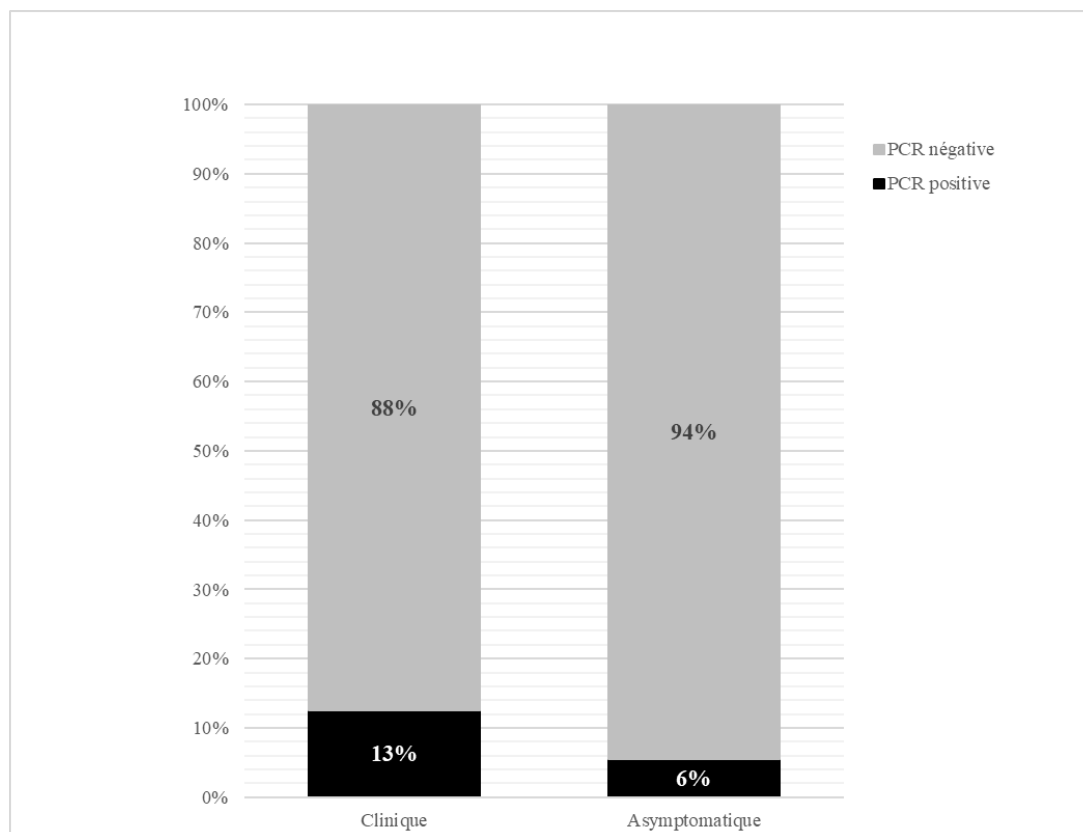


Figure 13 : Distribution des résultats de PCR des *Testudinid herpesvirus* selon le statut clinique.

3. Prévalence de *Mycoplasma agassizii* et des *Testudinid herpesvirus* en fonction de l'enclos de prélèvement

Les prélèvements ont été effectués dans dix enclos du refuge. Concernant *Mycoplasma agassizii*, un seul enclos ne présente aucun résultat positif. Cependant, un unique individu a pu être prélevé dans celui-ci. Au contraire, 5 enclos (50%) sur les 10 ont un taux de positivité supérieur à 66%, 3 enclos (30%) ont un taux de positivité compris entre 33 et 66% et 1 enclos (10%) a un taux de positivité inférieur à 33%. Ces résultats sont répertoriés dans le **Tableau 15** et la **Figure 14**. Pour les TeHV, la tendance est inversée. Seuls deux enclos présentent des taux de positivité non nuls : l'un de 40%, l'autre de 20%. Les résultats sont détaillés dans le **Tableau 15** et la

Figure 15.

Tableau 15 : Animaux testés et résultats des PCR pour *Mycoplasma agassizii* et TeHV en fonction de l'enclos de prélèvement.

N° d'enclos	Espèce	Effectif	Positif <i>M. agassizii</i>	Positif Herpesvirus
2	<i>T. hermanni boettgeri</i>	4	3 (75%)	0 (0%)
3	<i>T. hermanni hermanni</i>	5	4 (80%)	0 (0%)
4	<i>T. graeca</i>	1	0 (0%)	0 (0%)
6	<i>T. hermanni hermanni</i>	5	4 (80%)	0 (0%)
7	<i>T. hermanni boettgeri</i>	5	2 (40%)	2 (40%)
8	<i>T. graeca</i>	5	4 (80%)	1 (20%)
9	<i>T. marginata</i>	5	1 (20%)	0 (0%)
10	<i>T. horsfieldii</i>	3	3 (100%)	0 (0%)
11	<i>T. hermanni hermanni</i>	6	3 (50%)	0 (0%)
12	<i>T. graeca</i>	5	2 (40%)	0 (0%)

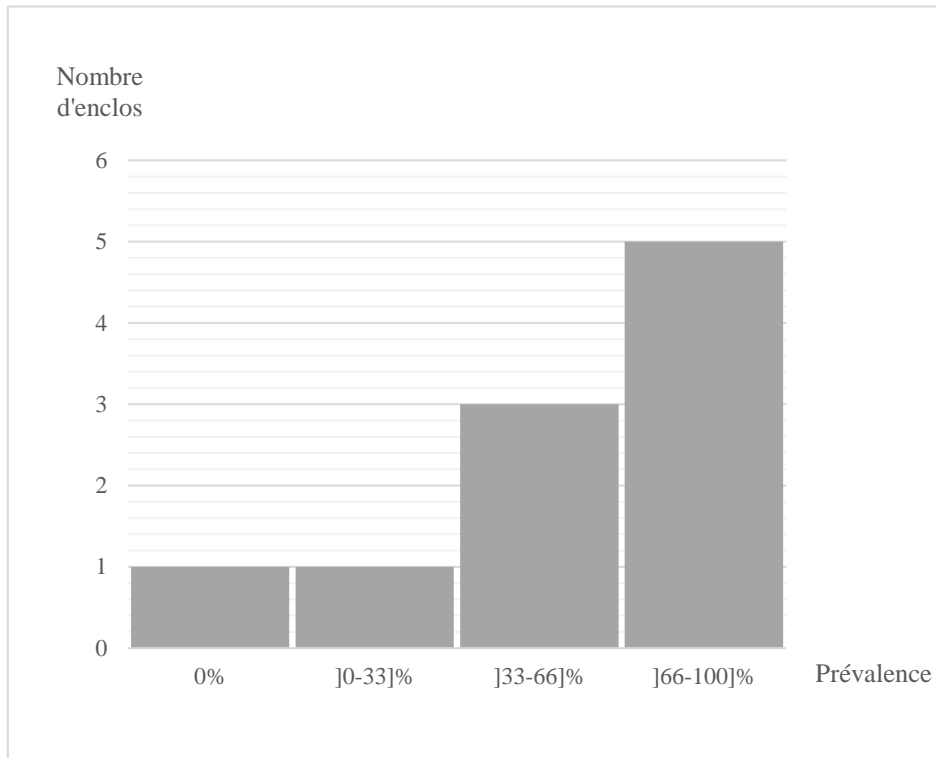


Figure 14 : Effectif d'enclos en fonction du taux de positivité de *Mycoplasma agassizii* dans ceux-ci.

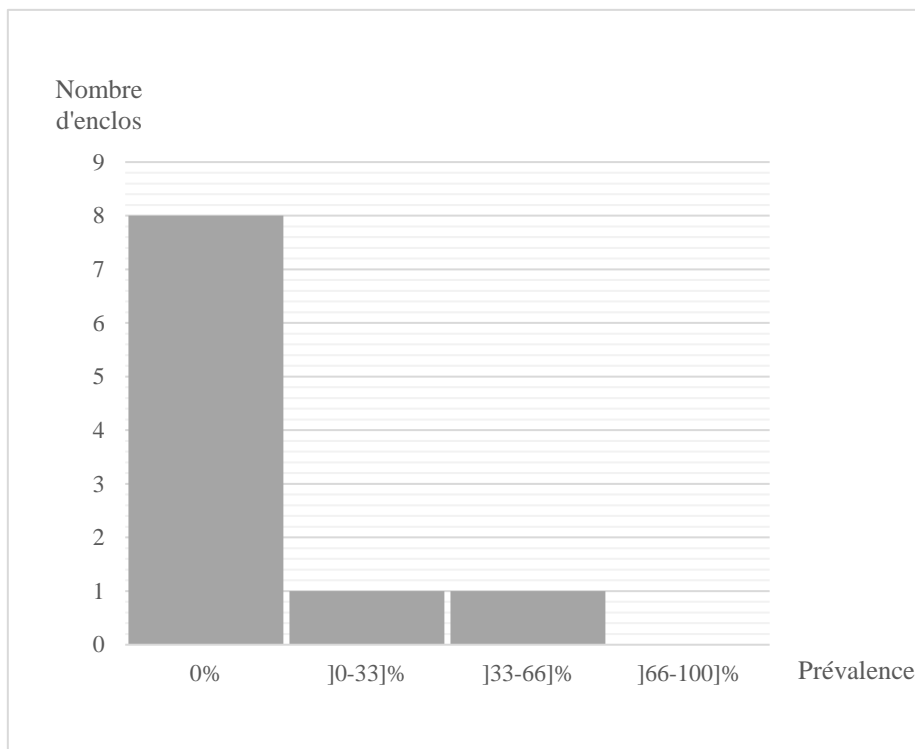


Figure 15 : Effectif d'enclos en fonction du taux de positivité des TeHV dans ceux-ci.

Ces diverses valeurs sont représentées sur une carte du refuge dans la **Figure 16** pour *Mycoplasma agassizii* et dans la **Figure 17** pour les TeHV. Pour *Mycoplasma agassizii*, on ne voit pas une zone fortement concentrée en positifs et des valeurs de prévalence décroissantes

en s'éloignant de cette zone. Par exemple, l'enclos 4 dans lequel aucun résultat positif n'a été détecté, est entouré par deux enclos (enclos 3 et enclos 6) à forte prévalence. La répartition des prévalences semble donc aléatoire.

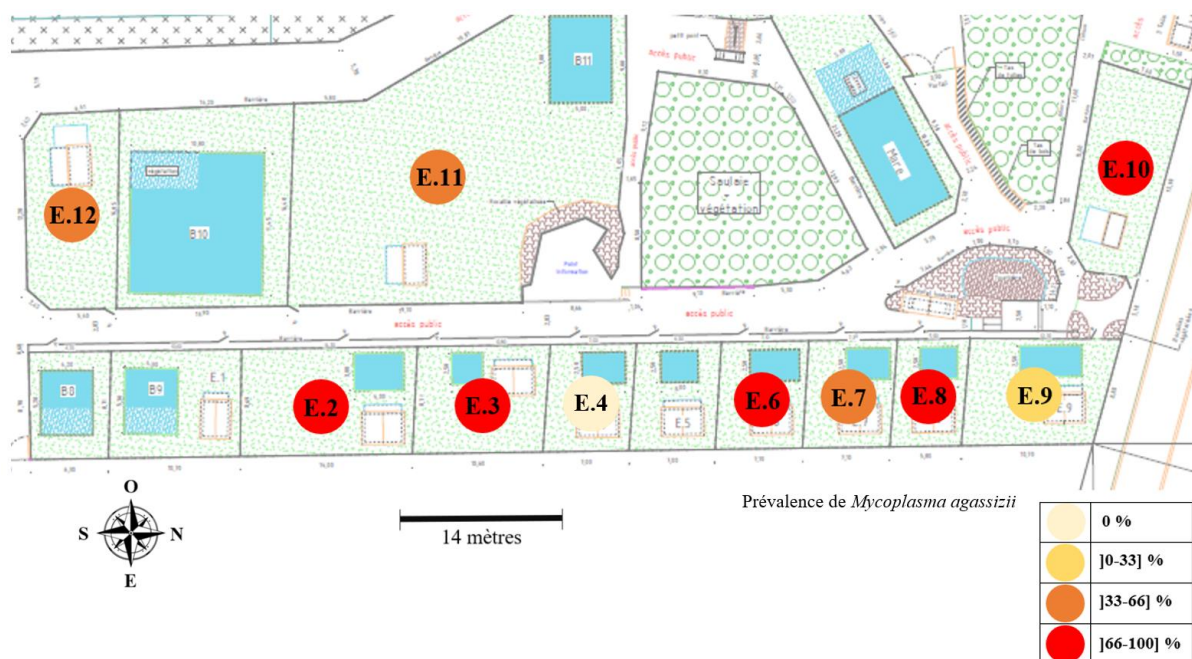


Figure 16 : Carte représentant la prévalence de *Mycoplasma agassizii* dans les différents enclos testés sur le refuge.

Dans le cas des TeHV, les deux seuls enclos ayant obtenu des résultats positifs en PCR (enclos 7 et enclos 8) sont placés l'un à côté de l'autre. Cependant, ce faible effectif ne permet pas de dégager une tendance quant à la répartition du virus.

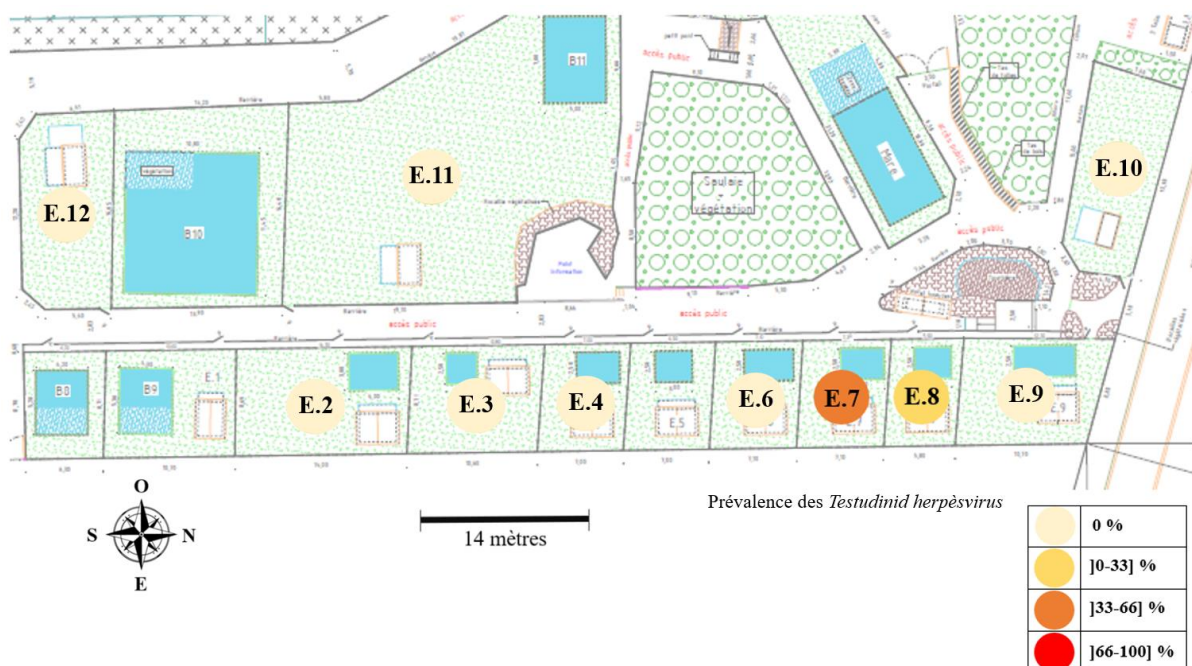


Figure 17 : Carte représentant la prévalence des *Testudinid herpesvirus* dans les différents enclos testés sur le refuge.

4. Corrélation entre les résultats PCR de *Mycoplasma agassizii* et des *Testudinid herpesvirus*

Dans la majorité des cas (55%), les tortues sont revenues uniquement positives pour *Mycoplasma agassizii*. Il a également été fréquent d'obtenir des échantillons négatifs pour les deux agents infectieux (39%). Seules 2 tortues (5%) sur les 44 prélevées ont présenté des résultats positifs pour les 2 PCR. Ces résultats sont présentés dans le **Tableau 16**. L'analyse statistique ne montre pas d'association significative entre la positivité à *Mycoplasma agassizii* et celle aux TeHV.

Tableau 16 : Correspondance des résultats de la PCR ciblant *Mycoplasma agassizii* et celle ciblant les *Testudinid herpesvirus*.

		<i>Mycoplasma agassizii</i>	
		Résultat positif	Résultat négatif
<i>Testudinid herpesvirus</i>	Résultat positif	2 (5%)	1 (2%)
	Résultat négatif	24 (55%)	17 (39%)

III. Discussion

1. Etude comparative de la prévalence dans le refuge

L'étude réalisée apporte de nouvelles données épidémiologiques concernant les infections par les TeHV et *Mycoplasma agassizii*. Les prévalences obtenues pour ces deux agents, respectivement 6,8% et 59,1% sont comparables à ceux obtenus dans une étude effectuée à l'échelle européenne dans laquelle les prévalences sont estimées à 8,0% et 42,2% (Kolesnik et al., 2017). Par ailleurs, leurs conditions de réalisation sont relativement similaires puisque les tortues prélevées vivent en captivité et ne présentent pas nécessairement d'atteinte de l'appareil respiratoire supérieur au moment du prélèvement. De plus, dans les deux cas, des écouvillons oro-pharyngés ont été combinés avec des lavages nasaux pour la réalisation des PCR. L'étude européenne ayant été menée sur 1015 tortues dont 832 individus du genre *Testudo*, l'échantillon utilisé pour la présente étude semble être représentatif.

Une autre publication, au contraire, aboutit à des résultats différents avec une valeur de prévalence pour *Mycoplasma agassizii* (6%) inférieure à celle des TeHV (25%) (Salinas et al., 2011). Ce rapport inversé pourrait être dû au fait que toutes les tortues prélevées présentaient des signes cliniques évocateurs d'un syndrome « rhinite stomatite conjonctivite » alors que dans

notre étude, 82% des individus étaient asymptomatiques. L'ensemble de ces résultats suggère que les TeHV seraient plus souvent associés à un état pathologique et *Mycoplasma agassizii* plus fréquent chez des tortues cliniquement saines (Salinas et al., 2011). A noter qu'une étude a obtenu des valeurs globalement plus élevées avec une prévalence de 75% pour *Mycoplasma agassizii* et de 48% pour les TeHV (Braun et al., 2014).

Ici, seule la PCR a été utilisée. C'est une technique pertinente car elle permet une estimation précise du nombre d'animaux susceptibles d'excréter activement l'agent infectieux. Il est donc par la suite plus aisé d'isoler les individus positifs et de limiter la dissémination du pathogène. Cependant, les infections latentes ne sont pas mises en évidence avec cette technique (Soares et al., 2004). Il aurait ainsi été intéressant de conjuguer cet examen avec des analyses sérologiques effectuées au même moment pour chaque individu prélevé, afin d'avoir une idée précise de son statut vis-à-vis des infections par les TeHV et *Mycoplasma agassizii*. En effet, un résultat PCR négatif n'exclut pas l'hypothèse d'une infection latente qui serait à l'origine d'une sérologie positive. En outre, l'excrétion de l'agent est dans certains cas trop faible pour être détectée par PCR, malgré la sensibilité tout de même satisfaisante de cette technique (Braun et al., 2014). Par ailleurs, *Mycoplasma agassizii* a tendance à coloniser les surfaces muqueuses des dépressions ventrolatérales du tractus respiratoire supérieur des chéloniens, le rendant peu accessible aux prélèvements et entraînant des risques de faux négatifs par PCR (Brown et al., 1999). Dans l'étude réalisée, le problème est minimisé par le fait d'effectuer à la fois un écouvillon oro-pharyngé et un lavage nasal. En effet, en combinant les deux modes de prélèvement, le taux de détection et donc la sensibilité sont augmentés (Kolesnik et al., 2017).

L'estimation de la prévalence a été réalisée à partir de 44 tortues. Cet effectif reste faible et peut-être insuffisant pour obtenir des résultats statistiques significatifs. Néanmoins, il est comparable à d'autres études épidémiologiques qui comptent respectivement 44 et 63 individus (Braun et al., 2014 ; Salinas et al., 2011).

En outre, un seul prélèvement a été effectué pour chaque tortue. Il aurait été intéressant d'en réaliser au minima deux : le premier avant l'entrée en hibernation mi-octobre et le second à la sortie de brumation vers le mois d'avril comme fait dans notre cas. C'est généralement au cours de ces deux périodes que les infections semblent être les plus fréquentes (Origgi, 2006). Dans notre étude, la prévalence reste pourtant relativement faible pour les deux agents et surtout très peu d'individus expriment des signes cliniques. Ceci témoigne d'une gestion efficace des animaux du refuge et de conditions de vie adaptées à leurs besoins, leur permettant de lutter contre les pathogènes. Par ailleurs, l'hibernation est une étape critique pendant laquelle le métabolisme de la tortue ralentit jusqu'à atteindre des niveaux très bas. Le système immunitaire

est alors affaibli (Sandmeier et al., 2016). Ainsi, les individus porteurs asymptomatiques à l'entrée en hibernation sont plus susceptibles d'exprimer des signes cliniques au printemps. Il serait donc pertinent de réaliser deux séries de prélèvements afin d'évaluer l'évolution de la prévalence au cours du temps. Par ailleurs, dans notre étude où une seule série a pu être mise en œuvre, il aurait pu être judicieux de la mener à l'automne dans une logique de prévention. En effet, elle aurait permis de détecter les individus atteints et ainsi de les empêcher d'hiberner puisque cette période présente un risque pour tout animal malade, amaigri avec une altération de l'état général.

2. Influence de l'espèce de tortue sur la prévalence

Concernant l'influence de l'espèce de tortue sur les résultats PCR, la tendance qui se dégage dans l'étude suit les différentes conclusions déjà présentes dans la littérature. Dans le cas de *Mycoplasma agassizii*, la plus forte prévalence est retrouvée chez la Tortue des steppes. L'infection semble donc être plus probable chez cette espèce que chez les autres tortues du genre *Testudo* bien que ce résultat ne soit pas statistiquement significatif. D'autres publications arrivent à cette même conclusion (Kolesnik et al., 2017 ; Soares et al., 2004). Cependant, ce résultat est à nuancer car dans notre cas, l'effectif prélevé au sein de cette espèce est très réduit (trois individus) et donc peu comparable avec les autres espèces. Un deuxième biais à prendre en considération est que dans le refuge, les tortues sont réparties dans les enclos par espèce. Compte tenu de la contagiosité des agents pathogènes, les individus d'un même enclos ont de plus fortes chances d'être infectés lorsqu'ils sont en contact direct avec une tortue malade, ce qui peut être à l'origine d'une influence artificielle de l'espèce de tortue.

En outre, la présence de TeHV a été détectée uniquement chez deux tortues d'Hermann (*Testudo hermanni boettgeri*) et une tortue grecque. Ce résultat concorde partiellement avec une étude épidémiologique antérieure dans laquelle l'infection par l'agent viral semble plus probable pour la Tortue grecque et la Tortue bordée (Soares et al., 2004). De la même manière que précédemment, l'échantillonnage de notre étude peut être à l'origine d'un biais puisque 25 tortues d'Hermann ont été prélevées contre 11 tortues grecques et 5 tortues bordées. En effet, plusieurs enclos testés abritant la même espèce, les effectifs finaux par espèce sont très disparates et il est nécessaire d'interpréter les résultats avec précaution. Il est assurément difficile d'effectuer une comparaison à partir d'effectifs très différents et d'un nombre d'individus positifs très faible.

La prévalence plus forte chez la Tortue grecque pourrait s'expliquer par une sensibilité plus importante à l'infection chez cette espèce qui agirait comme un réservoir (Soares et al., 2004).

Par ailleurs, chez d'autres espèces comme la Tortue des steppes, l'infection entraîne plus souvent une clinique marquée avec une issue fatale rapide (McArthur et al., 2002). Les individus meurent donc généralement avant qu'un diagnostic ait pu être émis.

3. Corrélation entre l'expression clinique et la présence de l'agent pathogène

L'étude n'a pas mis en évidence de lien entre l'expression de signes cliniques et la détection d'une infection aussi bien pour les TeHV que pour *Mycoplasma agassizii*. Respectivement, 13% et 63% des individus symptomatiques ont une PCR positive mais cette différence n'est pas significative. La présence de symptômes évocateurs n'est donc pas nécessairement associée à la présence d'un des deux agents. Ceci peut être relié au fait que d'autres agents infectieux, notamment viraux, sont responsables de signes cliniques comparables. Une infection par un ranavirus (*Iridoviridae*) ou un topivirus (*Picornaviridae*) s'accompagne en effet de stomatite et de conjonctivite (Marschang, 2011). En outre, les études déjà publiées peuvent parfois s'avérer contradictoires, en particulier pour *Mycoplasma agassizii*. D'une part, il a été démontré que cet agent est une cause de syndrome rhinite chez les chéloniens (Brown et al., 1994). D'autre part, sa prévalence peut être forte dans des populations de tortues asymptomatiques et faible chez des groupes d'individus malades (Salinas et al., 2011). Ainsi, les publications plus récentes ne mettent pas en évidence de corrélation entre la présence de signes cliniques et la détection de *Mycoplasma agassizii* (Salinas et al., 2011 ; Soares et al., 2004). Ces différences observées entre les études pourraient s'expliquer par le caractère chronique de l'infection. Les individus atteints expriment de façon intermittente des signes cliniques dont la sévérité est variable (Brown et al., 1999 ; Schumacher et al., 1997). Par ailleurs, plusieurs souches de *Mycoplasma agassizii* sont décrites et possèdent des pouvoirs pathogènes différents, certaines étant à l'origine d'infections subcliniques (Jacobson et al., 1995). Pour les TeHV, seule la corrélation entre une PCR positive et des lésions de stomatite a pu être établie (Marschang et al., 1997).

4. Prévalence en fonction de l'enclos de prélèvement

L'étude de la prévalence au sein de chaque enclos a eu pour intérêt de vérifier les modes de transmission des deux agents et d'évaluer la facilité avec laquelle ils se disséminent. Tout d'abord, *Mycoplasma agassizii* a été détecté dans neuf enclos sur dix. De plus, un seul prélèvement a pu être effectué au lieu de cinq dans l'unique enclos avec une prévalence nulle, ce qui constitue un biais important. En effet, l'extériorisation de la tête s'est avérée très difficile car cet enclos contenait des tortues grecques mâles adultes. Ainsi, *Mycoplasma agassizii* est

présent dans presque tous les enclos testés. Par ailleurs, plus de la moitié ont des prévalences supérieures à 50%. La transmission horizontale par contacts directs semble être vérifiée (Jacobson et al., 2014). En outre, la contamination d'un individu à l'autre paraît facile puisqu'ici on remarque de nombreux enclos avec une forte prévalence et peu d'enclos avec une faible prévalence.

D'autre part, l'ADN de TeHV n'a été retrouvé que dans deux enclos et la prévalence ne dépasse jamais 50% (respectivement 20% et 40%) contrairement à ce qui a pu être obtenu pour *Mycoplasma agassizii*. La tendance est globalement inversée avec un faible effectif d'enclos où l'agent viral est présent, et une faible prévalence dans le peu d'enclos contaminé. Les deux seuls enclos avec une prévalence non nulle sont répartis côte à côte dans le refuge. De la même manière que précédemment, la transmission correspond bien à un mode horizontal par contacts entre les animaux (Ritchie, 2006). Les TeHV semblent néanmoins se disséminer plus difficilement que *Mycoplasma agassizii*.

Un biais à prendre en compte est que la densité de population n'est pas forcément identique dans tous les enclos. Or, dans le cas d'agents pathogènes qui se transmettent horizontalement via des sécrétions, un contact proche est indispensable pour qu'il y ait contamination et une forte densité augmente la probabilité de contacts entre les animaux. Cependant, cette information n'a pas été disponible pour notre étude donc il n'a pas été envisageable de confronter les prévalences avec les densités par enclos.

Par ailleurs, *Mycoplasma agassizii* a été retrouvé dans la presque totalité des enclos testés et il semble s'agir de la même souche pour tous les prélèvements. Ceci laisse suspecter une contamination non seulement au sein des enclos, mais également d'un enclos à l'autre. Néanmoins, étant donné le faible nombre d'animaux cliniques d'une part et un niveau de prévalence relativement bas d'autre part, la situation du refuge paraît stable et maîtrisée. Il pourrait être cependant intéressant de mettre en place en collaboration avec l'Association du Refuge des Tortues un dépistage régulier, en particulier pour les nouveaux arrivants. De plus, une séparation des groupes d'animaux négatifs et positifs dans des enclos différents pourrait s'avérer bénéfique pour favoriser une diminution de la prévalence, et d'autant plus si des mesures simples de biosécurité (désinfection des mains, pédiluve) sont mises en place de façon concomitante.

5. Co-infections entre les *Testudinid herpesvirus* et *Mycoplasma agassizii*

Mycoplasma agassizii et les TeHV ont été détectés simultanément sur 2 individus (4,5%). Ce résultat est comparable à ceux d'une étude espagnole et d'une étude européenne dans lesquelles les taux de co-détections sont respectivement de 3% et 5% (Salinas et al., 2011 ; Kolesnik et al., 2017). On suspecte que les deux agents pourraient avoir une action synergique et être à l'origine de présentations cliniques plus sévères que lorsque l'individu est infecté par un seul pathogène. En outre, une infection par *Mycoplasma agassizii* entrainerait une baisse d'immunité favorisant une contamination par d'autres agents opportunistes (Soares et al., 2004). Cependant, dans notre cas, un seul individu sur les deux co-infectés était clinique (blépharo-conjonctivite unilatérale). L'analyse statistique de notre étude montre que les deux types d'infection sont indépendants.

Conclusion

Les TeHV et *Mycoplasma agassizii* sont fréquemment rencontrés chez les chéloniens, aussi bien chez des populations sauvages que captives. Ils sont généralement associés à une atteinte de l'appareil respiratoire supérieur avec comme signes cliniques principaux une rhinite, une conjonctivite et pour les herpesvirus, une stomatite. Les différentes sécrétions (jetage nasal, écoulement oculaire, salive) constituent des sources d'infection témoignant d'un caractère fortement contagieux de ces agents. Cependant, ils sont bien souvent à l'origine d'infections chroniques et subcliniques, rendant leur diagnostic moins aisé.

Notre étude a eu pour but d'estimer la prévalence des deux pathogènes chez des espèces de tortues du genre *Testudo spp.*, au sein d'un refuge. Pour se faire, la présence d'ADN d'herpesvirus et de mycoplasmes a été détectée par des techniques biomoléculaires de PCR. Une souche de *Mycoplasma agassizii* a été identifiée dans la grande majorité des enclos testés, à la différence des herpesvirus où une souche de TeHV n'a été retrouvée que chez trois individus. Par ailleurs, parmi les résultats positifs, un très faible nombre d'individus présentaient des signes cliniques évocateurs d'une atteinte de l'appareil respiratoire supérieur au moment des prélèvements, montrant ainsi l'importance des porteurs asymptomatiques. Dans des refuges ou des collections privées de tortues, ces animaux sont particulièrement problématiques car l'agent pathogène est actif à bas bruit et la transmission horizontale reste possible à leur contact. Pourtant, n'étant pas différenciables des individus sains, ils font rarement l'objet de mesures de prévention. C'est ainsi que les pathogènes se disséminent au sein des populations et sont responsables d'une expression clinique chez des individus au système immunitaire moins compétent. Ils sont même parfois à l'origine de véritables épizooties comme cela a pu être le cas en 1989 chez des tortues du désert (*Gopherus agassizii*) (Brown et al., 1999). Une fois présents au sein d'un groupe d'animaux, il est illusoire d'espérer s'en affranchir complètement. En effet, les traitements couramment employés à ce jour n'ont pour but que d'atténuer les signes cliniques et d'aider à renforcer le système immunitaire de l'individu atteint. La réalisation d'un dépistage et l'application de mesures de prévention en conséquence paraissent donc indispensables. Des investigations plus approfondies concernant la gestion des tortues séropositives seraient à l'avenir intéressantes à mener. De la même façon, le risque qu'elles représentent pour des tortues saines est encore insuffisamment connu et nécessite des études supplémentaires. Par ailleurs, l'élaboration d'un vaccin contre les TeHV à partir de virus inactivé constitue une piste de recherche à creuser, malgré des résultats peu concluants jusqu'à présent (Marschang et al., 2001).

Bibliographie

BENNETT, T., 2011. The Chelonian Respiratory System. In : *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*. mai 2011. Vol. 14, n° 2, p. 225-239. DOI 10.1016/j.cvex.2011.03.005.

BERRY, K. H., BAILEY, T. Y. et ANDERSON, K. M., 2006. Attributes of desert tortoise populations at the National Training Center, Central Mojave Desert, California, USA. In : *Journal of Arid Environments*. janvier 2006. Vol. 67, p. 165-191. DOI 10.1016/j.jaridenv.2006.09.026.

BICKNESE, E. J., CHILDRESS, A. L. et WELLEHAN, J. F. X., 2010. A Novel Herpesvirus of the Proposed Genus Chelonivirus from an Asymptomatic Bowsprit Tortoise (*Chersina angulata*). In : *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. juin 2010. Vol. 41, n° 2, p. 353-358. DOI 10.1638/2009-0214R.1.

BLAHAK, S. et BIERMANN, R., 1995. Herpesvirus infection in land tortoises as a problem of chelonian conservation. In : *Proceedings: International Congress of Chelonian Conservation*. SOPTOM. 1995. p. 240-243.

BOYER, T. H., 1998. Emergency Care of Reptiles. In : *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*. septembre 1998. Vol. 1, n° 1, p. 191-206. DOI 10.1016/S1094-9194(17)30161-5.

BRAUN, J., SCHRENZEL, M., WITTE, C., GOKOOL, L., BURCHELL, J. et RIDEOUT, B. A., 2014. Molecular methods to detect *Mycoplasma* spp. and Testudinid Herpesvirus 2 in Desert tortoises (*Gopherus agassizii*) and implications for disease management. In : *Journal of Wildlife Diseases*. octobre 2014. Vol. 50, n° 4, p. 757-766. DOI 10.7589/2013-09-231.

BROWN, D. R., CRENSHAW, B. C., MCLAUGHLIN, G. S., SCHUMACHER, I. M., MCKENNA, C. E., KLEIN, P. A., JACOBSON, E. R. et BROWN, M. B., 1995. Taxonomic Analysis of the Tortoise *Mycoplasmas* *Mycoplasma agassizii* and *Mycoplasma testudinis* by 16S rRNA Gene Sequence Comparison. In : *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1 avril 1995. Vol. 45, n° 2, p. 348-350. DOI 10.1099/00207713-45-2-348.

BROWN, D. R. et JACOBSON, E. R., 2002. Applications of diagnostic tests for mycoplasmal infections of Desert and Gopher Tortoises, with management recommendations. In : *Chelonian Conservation and Biology*. janvier 2002. p. 497-507.

BROWN, M. B., MCLAUGHLIN, G. S., KLEIN, P. A., CRENSHAW, B. C., SCHUMACHER, I. M., BROWN, D. R. et JACOBSON, E. R., 1999. Upper respiratory tract disease in the gopher tortoise is caused by *Mycoplasma agassizii*. In : *Journal of Clinical Microbiology*. juillet 1999. Vol. 37, n° 7, p. 2262-2269.

BROWN, M. B., SCHUMACHER, I. M., KLEIN, P. A., HARRIS, K., CORRELL, T. et JACOBSON, E. R., 1994. *Mycoplasma agassizii* causes upper respiratory tract disease in the desert tortoise. In : *Infection and Immunity*. octobre 1994. Vol. 62, n° 10, p. 4580-4586.

CHITTY, J. et RAFTERY, A., 2013a. Clinical Pathology. In : *Essentials of Tortoise Medicine and Surgery*. S.l. : Wiley. p. 150-178.

CHITTY, J. et RAFTERY, A., 2013b. Nasal Discharge. In : *Essentials of Tortoise Medicine and Surgery*. S.l. : Wiley. p. 235-238.

CHITTY, J. et RAFTERY, A., 2013c. Ocular and Conjunctival/Palpebral Swelling. In : *Essentials of Tortoise Medicine and Surgery*. S.l. : Wiley. p. 239-241.

CHITTY, J. et RAFTERY, A., 2013d. Practice Needs. In : *Essentials of Tortoise Medicine and Surgery*. S.l. : Wiley. p. 54-62.

CITES, 2019. *CITES : Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction*. [en ligne]. 2019. S.l. : s.n. [Consulté le 6 octobre 2019]. Disponible à l'adresse : <https://www.cites.org/>.

CITTI, C. et BLANCHARD, A., 2013. Mycoplasmas and their host : emerging and re-emerging minimal pathogens. In : *Trends in Microbiology*. avril 2013. Vol. 21, n° 4, p. 196-203. DOI 10.1016/j.tim.2013.01.003.

DIEMER BERISH, J. E., WENGLAND, L. D. et GATES, C. A., 2000. Distribution and Prevalence of Upper Respiratory Tract Disease in Gopher Tortoises in Florida. In : *Journal of Herpetology*. mars 2000. Vol. 34, n° 1, p. 5. DOI 10.2307/1565232.

DIEMER BERISH, J. E., WENGLAND, L. D., KILTIE, R. A., GARRISON, E. P. et GATES, C. A., 2010. Effects of Mycoplasmal Upper Respiratory Tract Disease on morbidity and mortality of Gopher tortoises in Northern and Central Florida. In : *Journal of Wildlife Diseases*. juillet 2010. Vol. 46, n° 3, p. 695-705. DOI 10.7589/0090-3558-46.3.695.

DRAKE, K. K., AIELLO, C. M., BOWEN, L., LEWISON, R. L., ESQUE, Todd C., NUSSEAR, K. E., WATERS, S. C. et HUDSON, P. J., 2019. Complex immune responses and molecular reactions to pathogens and disease in a desert reptile (*Gopherus agassizii*). In : *Ecology and Evolution*. mars 2019. Vol. 9, n° 5, p. 2516-2534. DOI 10.1002/ece3.4897.

DRURY, S. E., GOUGH, R. E., MCARTHUR, S. et JESSOP, M., 1998. Detection of herpesvirus-like and papillomavirus-like particles associated with diseases of tortoises. In : *The Veterinary Record*. 5 décembre 1998. Vol. 143, n° 23, p. 639.

FROST, J. W. et SCHMIDT, A., 1997. Serological evidence for susceptibility of various tortoise species to herpesvirus infection. In : *38 Internationalen Symposiums uber die Erkrankungen der Zoo und Wildtiere*. 11 mai 1997. p. 25-27.

GANDAR, F., MARLIER, D. et VANDERPLASSCHEN, A., 2019. In vitro and in vivo assessment of eprociclovir as antiviral treatment against testudinid herpesvirus 3 in Hermann's tortoise (*Testudo hermanni*). In : *Research in Veterinary Science*. juin 2019. Vol. 124, p. 20-23. DOI 10.1016/j.rvsc.2019.02.001.

HAEFELI, W. et SCHILDIGER, B. J., 1995. Reptilien. In : *Krankheiten der Zoound Wildtiere*. Berlin : Blackwell Wissenschafts-Verlag. p. 530-554.

HANNAN, P. C., WINDSOR, G. D., DE JONG, A., SCHMEER, N. et STEGEMANN, M., 1997. Comparative susceptibilities of various animal-pathogenic mycoplasmas to fluoroquinolones. In : *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. septembre 1997. Vol. 41, n° 9, p. 2037-2040. DOI 10.1128/AAC.41.9.2037.

HERVAS, J., SANCHEZ-CORDON, P. J., DE LARA, F. C., CARRASCO, L. et GOMEZ-VILLAMANDOS, J. C., 2002. Hepatitis Associated with Herpes Viral Infection in the Tortoise (*Testudo horsfieldii*). In : *Journal of Veterinary Medicine Series B*. mars 2002. Vol. 49, n° 2, p. 111-114. DOI 10.1046/j.1439-0450.2002.00522.x.

HUYNH, M., 2008. *Urgences chez les reptiles*. S.l. : s.n.

ICTV, 2018. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) - Taxonomy. In : [en ligne]. juillet 2018. [Consulté le 1 décembre 2019]. Disponible à l'adresse : <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>.

JACOBSON, E. R., BERRY, K. H., WELLEHAN, J. F. X., ORIGGI, F. C., CHILDRESS, A. L., BRAUN, J., SCHRENZEL, M., YEE, J. et RIDEOUT, B., 2012. Serologic and molecular evidence for Testudinid herpesvirus 2 infection in wild agassiz's desert tortoises, *Gopherus agassizii*. In : *Journal of Wildlife Diseases*. juillet 2012. Vol. 48, n° 3, p. 747-757. DOI 10.7589/0090-3558-48.3.747.

JACOBSON, E. R., BROWN, M. B. et SCHUMACHER, I. M., 1995. Mycoplasmosis and the desert tortoise (*Gopherus agassizii*) in Las Vegas Valley, Nevada. In : *Chelonian conservation and biology*. 1995. Vol. 1, n° 4, p. 279-284.

JACOBSON, E. R., BROWN, M. B., WENDLAND, L. D., BROWN, D. R., KLEIN, P. A., CHRISTOPHER, M. M. et BERRY, K. H., 2014. Mycoplasmosis and upper respiratory tract disease of tortoises: A review and update. In : *The Veterinary Journal*. septembre 2014. Vol. 201, n° 3, p. 257-264. DOI 10.1016/j.tvjl.2014.05.039.

JACOBSON, E. R., CLUBB, S. et GASKIN, J. M., 1985. Herpesvirus-like infection in Argentine tortoises. In : *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1985. Vol. 187, n° 11, p. 1227.

JACOBSON, E. R. et ORIGGI, F. C., 2002. Use of serology in reptile medicine. In : *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. janvier 2002. Vol. 11, n° 1, p. 33-45. DOI 10.1053/saep.2002.28239.

JOHNSON, A. J., PESSIER, A. P., X. WELLEHAN, J. F., BROWN, R. et JACOBSON, E. R., 2005. Identification of a novel herpesvirus from a California desert tortoise (*Gopherus agassizii*). In : *Veterinary Microbiology*. novembre 2005. Vol. 111, n° 1-2, p. 107-116. DOI 10.1016/j.vetmic.2005.09.008.

JOHNSON, J. D., 1998. A review of mycoplasmosis infections in tortoises and options for treatment. In : *Proceedings Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*. 1998.

KABISCH, D. et FROST, J. W., 1994. Isolation of Herpesvirus from *Testudo hermanni* and *Agrionemys horsfieldii*. In : *Verhandlungsbericht uber Erkrankungen der Zootiere*. 1994. p. 241-245.

KARLIN, M. L., 2008. Distribution of *Mycoplasma agassizii* in a Gopher Tortoise Population in South Florida. In : *Southeastern Naturalist*. mars 2008. Vol. 7, n° 1, p. 145-158. DOI 10.1656/1528-7092(2008)7[145:DOMAIA]2.0.CO;2.

KLAPHAKE, E., GIBBONS, P. M., SLADKY, K. K. et CARPENTER, J. W., 2018. Reptiles. In : *Exotic animal formulary*. Fifth edition. St. Louis, Missouri : Elsevier. p. 81-166. ISBN 978-0-323-44450-7. SF917 .C27 2018

KOLESNIK, E., OBIEGALA, A. et MARSCHANG, R. E., 2017. Detection of *Mycoplasma* spp., herpesviruses, topoviruses, and ferlaviruses in samples from chelonians in Europe. In : *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. novembre 2017. Vol. 29, n° 6, p. 820-832. DOI 10.1177/1040638717722387.

LOVICH, J. E., ENNEN, J. R., AGHA, M. et GIBBONS, J. W., 2018. Where Have All the Turtles Gone, and Why Does It Matter? In : *BioScience*. 1 octobre 2018. Vol. 68, n° 10, p. 771-781. DOI 10.1093/biosci/biy095.

MARENZONI, M. L., SANTONI, L., FELICI, A., MARESCA, C., STEFANETTI, V., SFORNA, M., FRANCIOSINI, M. P., CASAGRANDE PROIETTI, P. et ORIGGI, F. C., 2018. Clinical, virological and epidemiological characterization of an outbreak of Testudinid Herpesvirus 3 in a chelonian captive breeding facility : Lessons learned and first evidence of TeHV3 vertical transmission. In : MESSAOUDI, I. (éd.), *PLOS ONE*. 10 mai 2018. Vol. 13, n° 5, p. e0197169. DOI 10.1371/journal.pone.0197169.

MARSCHANG, R. E., 2011. Viruses Infecting Reptiles. In : *Viruses*. 1 novembre 2011. Vol. 3, n° 11, p. 2087-2126. DOI 10.3390/v3112087.

MARSCHANG, R. E., GLEISER, C. B., PAPP, T., PFITZNER, A. J. P., BÖHM, R. et ROTH, B. N., 2006. Comparison of 11 herpesvirus isolates from tortoises using partial sequences from three conserved genes. In : *Veterinary Microbiology*. octobre 2006. Vol. 117, n° 2-4, p. 258-266. DOI 10.1016/j.vetmic.2006.06.009.

MARSCHANG, R. E., GRAVENDYCK, M. et KALETA, E. F., 1997. Herpesviruses in Tortoises : Investigations into Virus Isolation and the Treatment of Viral Stomatitis in Testudo hermanni and T. graeca. In : *Journal of Veterinary Medicine, Series B*. 12 janvier 1997. Vol. 44, n° 1-10, p. 385-394. DOI 10.1111/j.1439-0450.1997.tb00989.x.

MARSCHANG, R. E., MILDE, K. et BELLAVISTA, M., 2001. Virus isolation and vaccination of Mediterranean tortoises against a chelonid herpesvirus in a chronically infected population in Italy. In : *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*. 2001. p. 376-379.

MARSCHANG, R. E. et SCHNEIDER, R. M., 2007. Antibodies to viruses in wild-caught spur-thighed tortoises (*Testudo graeca*) in Turkey. In : *Veterinary Record*. 21 juillet 2007. Vol. 161, n° 3, p. 102-103. DOI 10.1136/vr.161.3.102.

MATHES, K. A, JACOBSON, E. R. et BLAHAK, S., 2001. Mycoplasma and herpesvirus detection in European terrestrial tortoises in France and Morocco. In : *Proceedings of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*. Orlando, Florida, 2001. p. 18-23.

MCARTHUR, S., 2004a. Feeding techniques and fluids. In : *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*. S.I. : Blackwell. p. 257-272.

MCARTHUR, S., 2004b. Hospitalisation. In : *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*. S.I. : Blackwell. p. 239-256.

MCARTHUR, S., 2004c. Problem-solving approach to common diseases of terrestrial and semi-aquatic chelonians. In : *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*. S.I. : Blackwell. p. 309-378.

MCARTHUR, S., BLAHAK, S., KÖELLE, JACOBSON, E. R., MARSCHANG, R. E. et ORIGGI, F. C., 2002. Chelonian Herpesvirus. In : *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*. janvier 2002. p. 14-31.

MCCOY, E. D., 2008. A data aggregation problem in studies of upper respiratory tract disease of the gopher tortoise. In : *Herpetological review*. 2008. Vol. 39, n° 4, p. 419.

MEHLER, S. J. et BENNETT, R. A., 2006. Upper alimentary tract disease. In : *Reptile medicine and surgery*. 2. ed. St. Louis, Mo : Saunders Elsevier. p. 924-930. ISBN 978-0-7216-9327-9.

MITCHELL, M. A., 2006. Therapeutics. In : *Reptile medicine and surgery*. 2. ed. St. Louis, Mo : Saunders Elsevier. p. 631-664. ISBN 978-0-7216-9327-9.

MURAKAMI, M., MATSUBA, C., UNE, Y., NOMURA, Y. et FUJITANI, H., 2001. Development of Species-Specific PCR Techniques for the Detection of Tortoise Herpesvirus. In : *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. novembre 2001. Vol. 13, n° 6, p. 513-516. DOI 10.1177/104063870101300610.

MURO, J., RAMIS, A., PASTOR, J., VELARDE, R., TARRES, J. et LAVIN, S., 1998. Chronic rhinitis associated with herpesviral infection in captive Spur-thighed tortoises from Spain. In : *Journal of Wildlife Diseases*. juillet 1998. Vol. 34, n° 3, p. 487-495. DOI 10.7589/0090-3558-34.3.487.

ORIGGI, F. C., 2006. Herpesvirus in tortoises. In : *Reptile medicine and surgery*. 2. ed. St. Louis, Mo : Saunders Elsevier. p. 814-821. ISBN 978-0-7216-9327-9.

ORIGGI, F. C., 2012. Testudinid Herpesviruses : A Review. In : *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*. mars 2012. Vol. 22, n° 1-2, p. 42-54. DOI 10.5818/1529-9651-22.1-2.42.

ORIGGI, F. C., KLEIN, P. A., MATHES, K., BLAHAK, S., MARSCHANG, R. E., TUCKER, S. J. et JACOBSON, E. R., 2001. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detecting Herpesvirus Exposure in Mediterranean Tortoises (Spur-Thighed Tortoise [*Testudo graeca*] and Hermann's Tortoise [*Testudo hermanni*]). In : *Journal of Clinical Microbiology*. 1 septembre 2001. Vol. 39, n° 9, p. 3156-3163. DOI 10.1128/JCM.39.9.3156-3163.2001.

ORIGGI, F. C., KLEIN, P. A., TUCKER, S. J. et JACOBSON, E. R., 2003. Application of Immunoperoxidase-Based Techniques to Detect Herpesvirus Infection in Tortoises. In : *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. mars 2003. Vol. 15, n° 2, p. 133-140. DOI 10.1177/104063870301500207.

ORIGGI, F. C., ROMERO, C. H., BLOOM, D. C., KLEIN, P. A., GASKIN, J. M., TUCKER, S. J. et JACOBSON, E. R., 2004. Experimental Transmission of a Herpesvirus in Greek Tortoises (*Testudo graeca*). In : *Veterinary Pathology*. janvier 2004. Vol. 41, n° 1, p. 50-61. DOI 10.1354/vp.41-1-50.

ORIGGI, F. C., TECILLA, M., PILO, P., ALOISIO, F., OTTEN, P., AGUILAR-BULTET, L., SATTLER, U., ROCCABIANCA, P., ROMERO, C. H., BLOOM, D. C. et JACOBSON, E. R., 2015. A Genomic Approach to Unravel Host-Pathogen Interaction in Chelonians : The Example of Testudinid Herpesvirus 3. In : MUNDERLOH, U. G. (éd.), *PLOS ONE*. 5 août 2015. Vol. 10, n° 8, p. e0134897. DOI 10.1371/journal.pone.0134897.

PELLET, P. E. et ROIZMAN, B., 2013. Herpesviridae. In : *Fields Virology*. 6ème édition. S.l. : Lippincott Williams & Wilkins.

PERRY, S. M. et NEVAREZ, J. G., 2018. Pain and Its Control in Reptiles. In : *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*. janvier 2018. Vol. 21, n° 1, p. 1-16. DOI 10.1016/j.cvex.2017.08.001.

REAVILL, 2014. Common Pathology and Diseases seen in Pet Stores Reptiles (Chapter 2). In : *Current Therapy in Reptile Medicine and Surgery*. S.I. : Elsevier.

RITCHIE, B., 2006. Virology. In : *Reptile medicine and surgery*. 2. ed. St. Louis, Mo : Saunders Elsevier. p. 391-417. ISBN 978-0-7216-9327-9.

ROBERTSON, J. A., VEKRIS, A., BEBEAR, C. et STEMKE, G. W., 1993. Polymerase chain reaction using 16S rRNA gene sequences distinguishes the two biovars of *Ureaplasma urealyticum*. In : *Journal of Clinical Microbiology*. avril 1993. Vol. 31, n° 4, p. 824-830.

ROUSSELOT, J. F., 2019. Association du Refuge des Tortues. In : *Association du Refuge des Tortues* [en ligne]. 2019. Disponible à l'adresse : <http://www.lerefugedestortues.fr/index.php>.

SALINAS, M., FRANCINO, O., SÁNCHEZ, A. et ALTET, L., 2011. Mycoplasma and Herpesvirus PCR detection in tortoises with rhinitis-stomatitis complex in Spain. In : *Journal of Wildlife Diseases*. janvier 2011. Vol. 47, n° 1, p. 195-200. DOI 10.7589/0090-3558-47.1.195.

SANDMEIER, F. C., HORN, K. R. et TRACY, C. R., 2016. Temperature-independent, seasonal fluctuations in immune function of the Mojave Desert Tortoise (*Gopherus agassizii*). In : *Canadian Journal of Zoology*. août 2016. Vol. 94, n° 8, p. 583-590. DOI 10.1139/cjz-2016-0010.

SANDMEIER, F. C., TRACY, C. R., HAGERTY, B. E., DUPRÉ, S., MOHAMMADPOUR, H. et HUNTER, K., 2013. Mycoplasmal Upper Respiratory Tract Disease Across the Range of the Threatened Mojave Desert Tortoise: Associations with Thermal Regime and Natural Antibodies. In : *EcoHealth*. mars 2013. Vol. 10, n° 1, p. 63-71. DOI 10.1007/s10393-013-0835-5.

SCHUMACHER, I. M., BROWN, M. B., JACOBSON, E. R., COLLINS, B. R. et KLEIN, P. A., 1993. Detection of antibodies to a pathogenic mycoplasma in desert tortoises (*Gopherus agassizii*) with upper respiratory tract disease. In : *Journal of Clinical Microbiology*. juin 1993. Vol. 31, n° 6, p. 1454-1460.

SCHUMACHER, I. M., HARDENBROOK, D. B., BROWN, M. B., JACOBSON, E. R. et KLEIN, P. A., 1997. Relationship between clinical signs of Upper Respiratory Tract Disease and antibodies to *Mycoplasma agassizii* in Desert tortoises from Nevada. In : *Journal of Wildlife Diseases*. avril 1997. Vol. 33, n° 2, p. 261-266. DOI 10.7589/0090-3558-33.2.261.

SCHUMACHER, J., 1996. Viral diseases. In : *Reptile Medicine and Surgery*. Philadelphia : WB Saunders Co. p. 224-234.

SCHUMACHER, J. et YELEN, T., 2006. Anesthesia and analgesia. In : *Reptile medicine and surgery*. 2. ed. St. Louis, Mo : Saunders Elsevier. p. 442-452. ISBN 978-0-7216-9327-9.

SERGEANT, E., 2019. Epitools. In : *Epitools* [en ligne]. 2019. Disponible à l'adresse : <https://epitools.ausvet.com.au/>.

SOARES, J. F., CHALKER, V. J., ERLES, K., HOLTBY, S., WATERS, M. et MCARTHUR, S., 2004. Prevalence of *Mycoplasma agassizii* and chelonian Herpesvirus in captive tortoises (*Testudo* sp.) in the United Kingdom. In : *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. mars 2004. Vol. 35, n° 1, p. 25-33. DOI 10.1638/02-092.

SPADOLA, F., MORICI, M. et KNOTEK, Z., 2015. Combination of lidocaine/prilocaine with tramadol for short time anaesthesia-analgesia in chelonians: 18 cases. In : *Acta Veterinaria Brno*. 2015. Vol. 84, n° 1, p. 71-75. DOI 10.2754/avb201585010071.

TEIFKE, J. P., LÖHR, C. V., MARSCHANG, R. E., OSTERRIEDER, N. et POSTHAUS, H., 2000. Detection of Chelonid Herpesvirus DNA by Nonradioactive in Situ Hybridization in Tissues from Tortoises Suffering from Stomatitis—Rhinitis Complex in Europe and North America. In : *Veterinary Pathology*. septembre 2000. Vol. 37, n° 5, p. 377-385. DOI 10.1354/vp.37-5-377.

VANDEVANTER, D. R., WARRENER, P., BENNETT, L., SCHULTZ, E. R., COULTER, S., GARBER, R. L. et ROSE, T. M., 1996. Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. In : *Journal of Clinical Microbiology*. juillet 1996. Vol. 34, n° 7, p. 1666-1671.

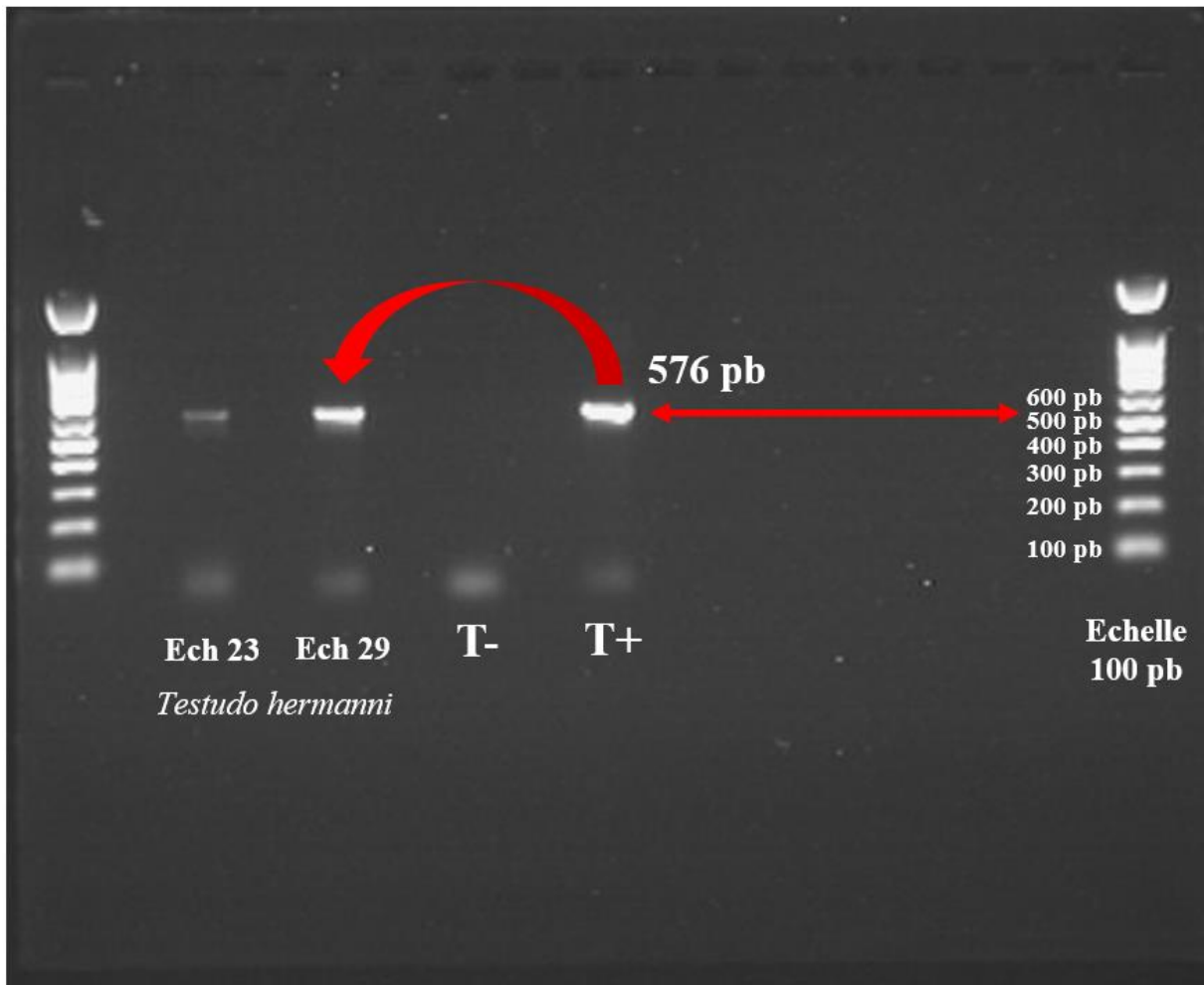
WENDLAND, L. D., BROWN, D. R., KLEIN, P. A. et BROWN, M. B., 2006. Upper respiratory tract disease (Mycoplasmosis) in tortoises. In : *Reptile medicine and surgery*. 2. ed. St. Louis, Mo : Saunders Elsevier. p. 931-938. ISBN 978-0-7216-9327-9.

WENDLAND, L. D., WOODING, J., WHITE, C. L., DEMCOVITZ, D., LITTELL, R., DIEMER BERISH, J. E., OZGUL, A., OLI, M. K., KLEIN, P. A., CHRISTMAN, M. C. et BROWN, M. B., 2010. Social behavior drives the dynamics of respiratory disease in threatened tortoises. In : *Ecology*. mai 2010. Vol. 91, n° 5, p. 1257-1262. DOI 10.1890/09-1414.1.

ZANGGER, N., SACHSSE, W. et MÜLLER, M., 1990. Herpesvirus-Epidemie bei der griechischen (*Testudo Hermannii*) und der maurischen Landschildkröte (*Testudo Graeca*) in der Schweiz. In : *Orell Füssli* [en ligne]. 1990. [Consulté le 3 août 2019]. DOI 10.5169/seals-591124. Disponible à l'adresse : <https://www.e-periodica.ch/digbib/view?pid=sat-003:1990:132::683>.

Annexes

Annexe 1 : Exemple de résultats positifs obtenus après électrophorèse dans le cas de la détection de *Mycoplasma agassizii* par PCR (Brown et al., 1995).



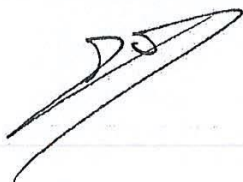
FICHE PRELEVEMENT HERPES / MYCOPLASMES n°		
IDENTIFICATION TORTUE		
Date :		
Numéro d'identification :		
Numéro d'enclos :		
Espèce :	Age :	Sexe : F - M
EXAMEN CLINIQUE		
<u>Examen à distance :</u>		
Attitude / Vigilance :	<input type="radio"/> Normale <input type="radio"/> Abattement	<input type="radio"/> Hypovigilance
Etat d'embonpoint :	<input type="radio"/> Bon état <input type="radio"/> Maigre	<input type="radio"/> Obèse
Etat d'hydratation :	<input type="radio"/> Normal <input type="radio"/> Perte d'élasticité peau	<input type="radio"/> Enophtalmie
Respiration :	<input type="radio"/> Normale <input type="radio"/> Bruyante	<input type="radio"/> Orthopnée
<u>Examen de la tête :</u>		
Yeux :	<input type="radio"/> Normaux	
	<input type="radio"/> Ecoulements : <input type="radio"/> Epiphora <input type="radio"/> Chassie <input type="radio"/> Unilatérale <input type="radio"/> Bilatérale	
	<input type="radio"/> Blépharite/Conjonctivite	
Narines :	<input type="radio"/> Normales <input type="radio"/> Jetage : <input type="radio"/> Séreux <input type="radio"/> Muqueux <input type="radio"/> Purulent	
Cavité buccale :	<input type="radio"/> Normale <input type="radio"/> Stomatite : <input type="radio"/> Pétéchies/ecchymoses	
	<input type="radio"/> Ulcères	
	<input type="radio"/> Nécrose, placards fibrineux	
Conclusion :	<input type="radio"/> SYMPTOMATIQUE <input type="radio"/> NON SYMPTOMATIQUE	
<u>Auscultation :</u>		
Fréquence respiratoire :		
MENSURATIONS		
Poids :		
Longueur écailles gulaires – supracaudale :		
Poids idéal :		
NB : $Pi = 0,191 \times L^3$		

AGREMENT SCIENTIFIQUE

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

Je soussigné, Guillaume LE LOC'H, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **Claire MAURIN** intitulée « **Prévalence et diversité des Testudinid herpesvirus et mycoplasmes dans un refuge de tortues** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

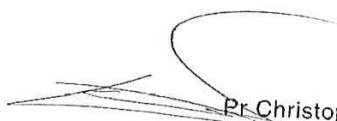
Fait à Toulouse, le 18/11/2019
Docteur Guillaume LE LOC'H
Maitre de Conférences
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



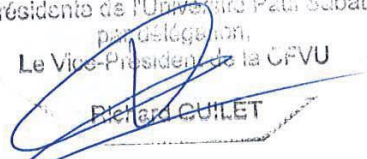
Vu :
Le Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pierre SANS




Vu :
Le Président du jury :
Professeur Christophe PASQUIER


Pr Christophe PASQUIER
Virologie - Plateau Technique d'Infectiologie
Institut Fédératif de Biologie
330 av. de Grande Bretagne
F 31059 TOULOUSE Cedex 9

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

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

Richard CUILET

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



PREVALENCE DES *TESTUDINID HERPESVIRUS* ET DES *MYCOPLASMES* DANS UN REFUGE DE TORTUES

Les *Testudinid herpesvirus* et *Mycoplasma agassizii* sont les principales causes du syndrome rhinite-stomatite-conjonctivite fréquemment rencontré chez les tortues terrestres captives et sauvages. En avril 2019, 44 tortues (*Testudo spp.*) ont été prélevées par écouvillon oro-pharyngé et rinçage nasal dans un refuge du sud-ouest de la France et des réactions en chaîne par polymérase (PCR) ont été effectuées afin de rechercher la présence d'ADN de TeHV et de *M. agassizii*. Les TeHV et *M. agassizii* ont été détectés chez 6,8% et 59,1% des individus respectivement, avec un taux de co-infection de 4,5%. Le séquençage a mis en évidence la présence de *TeHV-3* uniquement, ainsi qu'une souche de *M. agassizii*. Les TeHV ont surtout été détectés chez *Testudo hermanni* alors que *Testudo horsfieldii* est l'espèce la plus infectée par *M. agassizii* avec une prévalence de 100%. Aucune corrélation entre la détection de l'agent infectieux et l'expression de signes cliniques n'a pu être confirmée.

Mots-clés : herpesvirus, mycoplasma, prevalence, pcr, tortue

PREVALENCE OF *TESTUDINID HERPESVIRUS* AND *MYCOPLASMA* IN A TORTOISE'S SHELTER

Testudinid herpesvirus and *Mycoplasma agassizii* are the most important causative agents of rhinitis-stomatitis-conjunctivitis complex, which is commonly seen in captive and wild tortoises. In April 2019, 44 tortoises (*Testudo spp.*) were collected by oral swabs and nasal washes in a shelter in the south-west of France and polymerase chain reactions (PCR) were conducted in order to search for the presence of TeHV and *M. agassizii*'s DNA. TeHV et *M. agassizii* were detected in 6,8% and 59,1% of individuals, respectively, with 4,5% of co-detections. Sequencing revealed the presence of *TeHV-3* only, as well as a *M. agassizii* strain. TeHV were mainly detected in *Testudo hermanni* while *Testudo horsfieldii* is the most infected species with *M. agassizii* with a 100% prevalence rate. No correlation between the infectious agent detection and clinical signs could be confirmed.

Key words : herpesvirus, mycoplasma, prevalence, pcr, tortoise